

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Dido Eliphas Leão de Alencar

A EXPRESSÃO DE HER2-LOW NO CÂNCER DE MAMA

**PORTO ALEGRE
2022**

DIDO ELIPHAS LEÃO DE ALENCAR

A EXPRESSÃO DE HER2-LOW NO CÂNCER DE MAMA

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para inscrição no processo seletivo.

Orientadora: prof. Adriana Vial Roehe

**PORTO ALEGRE
2022**

SUMÁRIO

Introdução	4
Referencial teórico	5
Justificativa	8
Objetivo Geral.....	9
Objetivos específicos	9
Materiais e métodos.....	9
Critérios de Inclusão	10
Critérios de exclusão.....	10
Delineamento	10
Tamanho amostral	10
Local de realização da Pesquisa	11
Procedimentos experimentais	11
Análise Estatística.....	11
Aspectos Éticos.....	11
Orçamento	12
Cronograma	13
Referências	15
Anexos.....	20

Resumo

O câncer de mama em mulheres é uma doença com incidência e prevalência elevadas, sendo alvo constante de estudos a fim de uma melhor caracterização de aspectos moleculares a fim de otimizar terapias quimioterápicas. A associação de drogas anticorpo-fármaco mostrou resultados consistentes no tratamento de carcinomas caracterizados como HER2 negativos, trazendo questionamentos a respeito da atual classificação utilizada para a interpretação do estudo imuno-histoquímico deste marcador. Novas análises sugerem a inclusão de uma nova graduação: o HER2-low, que inclui as classificações de 1+ e 2+ em seu escopo e amplia as armas terapêuticas nos tratamentos de pacientes com HER2 considerado negativo. Ainda existem discrepâncias na literatura a respeito das diferenças de desfecho desta classificação. Com base neste pleito o presente projeto objetiva analisar dados de pacientes com câncer de mama e comparar os diferentes desfechos clínicos de pacientes HER2-low com a classificação para HER2 descrita nos atuais *guidelines*.

Introdução

O câncer de mama (CM) em mulheres é um dos tumores mais prevalentes e a principal causa de morte no sexo feminino, considerando a epidemiologia global. A descoberta na década de 80 da super-expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), um importante proto-oncogene presente em 15 a 30% dos tumores de mama, criou uma possibilidade de alvo farmacológico que foi consolidada na década de 90, levando, assim, a melhora de sobrevida e tempo livre de doença destas pacientes. (SUNG 2020 *et al.*; VENETIS *et al.*, 2022; TAVASSOLI *et al.*, 2003; PONDÉ *et al.*, 2020)

A evolução dos meios diagnósticos, a otimização de tratamentos e alvos terapêuticos, juntamente com a progressão do conceito de medicina de precisão, trouxe um aumento no número de pesquisas que se utilizam de meios

moleculares e imunoistoquímicos para a caracterização pormenorizada de subtipos de neoplasias de mama. Houve a percepção, em estudos realizados recentemente entre 2018 e 2022, de casos em que a doença com classificação do HER2 de 1+ e 2+ (recentemente interpretados como HER2-low) apresentaram expressiva resposta à nova associação de quimioterápicos classificados como anticorpo-fármaco combinados. (PONDÉ *et al.*, 2018; BANERJI *et al.*, 2019; MODI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022; TARANTINO *et al.*, 2020)

Para a análise se considera um score de pontuação entre 0 e 3, sendo a pontuação 0, 1+ e 2+ consideradas negativas e o score 3+ como positivo. A diferenciação é feita de acordo com a regularidade e intensidade da coloração da membrana celular no estudo imunoistoquímico. Na classificação dos subtipos do câncer de mama, para além do HER, busca-se a presença ou ausência de marcadores hormonais para receptores de estrogênio (RE) e / ou progesterona (RP) e se estima o índice de proliferação baseado no estudo da expressão de Ki-67. (WOLFF *et al.*, 2018)

Por conseguinte, devido este achado, surge a necessidade de recategorizar a classificação dos *guidelines* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO) (WOLFF *et al.*, 2018). Há a expectativa que com um maior refinamento da classificação obteremos melhores resultados terapêuticos. (ZHANG *et al.*, 2021; *ibidem* 2022; XU *et al.*, 2022; WON *et al.*, 2022; TARANTINO *et al.*, 2022; VENETIS *et al.*, 2022).

Referencial teórico

Dados coletados na última década mostram que o câncer de mama em mulheres é a neoplasia mais prevalente na população mundial. São 7.8 milhões de pacientes convivendo com a doença, 2.3 milhões de novos diagnósticos e cerca de 685.000 mortes por ano. A faixa etária de incidência é variável, acometendo

desde pacientes jovens até em idades mais avançadas. Alguns fatores de risco são bem conhecidos na literatura, porém vale ressaltar que aproximadamente 50% dos tumores não possuem correlação direta com as exposições ambientais, logo o rastreamento adequado se mostra a forma de maior impacto na redução de mortalidade. (SUNG *et al.*, 2021; DESANTIS *et al.*, 2015)

A descoberta de métodos como o tissue microarray (TMA), descrito inicialmente em Konen *et al.* (1998), tornou possível caracterizar, entre outras coisas, aspectos moleculares de processos neoplásicos e localizar novos alvos farmacológicos, algo que poderia otimizar o tratamento de diversas patologias. A imuno-histoquímica (IHC), técnicas de hibridização de RNA e de fluorescência são derivadas do TMA, sendo a IHC uma das principais maneiras de avaliar a expressão proteica presente nos diferentes subtipos de carcinomas de mama. (KONEN *et al.*, 1998, SIMON *et al.*, 2003).

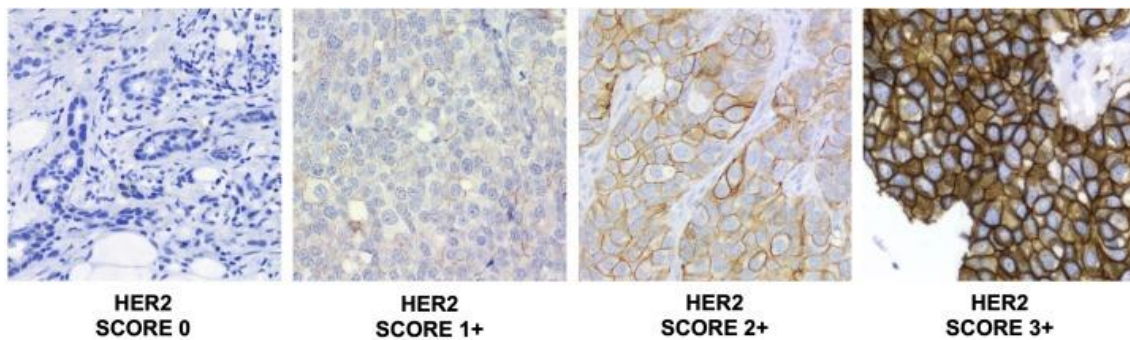
O reconhecimento do *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (HER2) como oncogene presente nas neoplasias de mama, atingindo até 30% dos casos, fez com que se tornasse alvo de estudo farmacológico. Na década de 90 surgiram os primeiros quimioterápicos anti-HER com impacto no tratamento oncológico, evidenciando, desta maneira, a importância deste marcador como alvo de estudo terapêutico. (SHAK *et al.*, 1999; ROSS;FLETCHER, 1999)

Conforme o citado por Vieira *et. al* (2007), o reconhecimento de padrões clínico-moleculares dos CM possibilitou sua subdivisão em cinco grupos: luminal A, luminal B, super-expressão de HER2, basal e normal-breast like. Cabe citar que a diferenças entre cada um dos grupos engloba a expressão ou não de Receptores de estrogênio (RE)/Receptores de progesterona (RP), HER2 e / ou citoqueratinas, além de alguns parâmetros clínicos como sobrevida e tempo livre de doença. Com base nestes parâmetros foi possível padronizar tratamentos e ter maior previsibilidade do curso clínico da doença.

Para a quantificação da expressão do HER2, seguindo os *guidelines* de 2018 do CAP, se considera um escore de pontuação entre 0 e 3, sendo a pontuação 0, 1+ e 2+ consideradas negativas e o score 3+ (imagem 1-0) como positivo. A avaliação é feita de acordo com a regularidade e intensidade da coloração da membrana celular no estudo imunoistoquímico. O HER2 negativo escore 2+

possui mais de 10% das células neoplásicas com marcação de moderada a fraca em suas membranas em mais de 10% das células ou intensa, porém em menos de 10% das células. Já o HER2 negativo escore 1+ deve mostrar coloração incompleta e / ou de fraca intensidade em mais de 10% das células neoplásicas. (WOLFF *et al.*, 2018; MARCHIO *et al.*, 2021)

Figura 1-0: Padrões para interpretação do HER2 na imunohistoquímica



Fonte: MARCHIO *et. al* (2021)

O tratamento com quimioterápicos anti-HER mostrou-se um avanço na oncologia, superando uma barreira no tratamento do CM, melhorando expressivamente a sobrevida das pacientes. No entanto a utilização destas terapias estava orientada pela dicotomia entre a positividade ou não da expressão de HER2. Os recentes ensaios clínicos com foco em terapias anti-HER em forma de conjugado anticorpo-fármaco (a exemplo trastuzumab-deruxtecan) mostraram eficácia não apenas nos casos de super-expressão de HER2, com resultados significativos nos casos de tumores HER2 escore 1+ e 2+ sem amplificação. (DIECI;MIGLIETTA 2021; PONDÉ *et al.*, 2018; BANERJI *et al.*, 2019; MODI *et al.*, 2020)

Concluiu-se, então, que as categorias antes incluídas como HER2-negativas, porém com expressão no escore 1+ ou 2+, não estariam relacionadas, inequivocamente, com a ausência completa da participação deste proto-oncogene em seu desenvolvimento. Portanto a sugestão de uma nova nomenclatura, o HER2-low, aparece na literatura para distinguir estes casos dos verdadeiros negativos. (VIALE;FUSCO *et. al* 2021, TARANTINO *et. al* 2020; SHU *et al.*, 2022).

Apesar da definição clara não houve ainda a inclusão formal do HER2-low na classificação do CAP/ASCO. Venetis *et al.* (2022) sugere ainda, ainda, a

existência do HER2-ultra low cujo pode ser definido, como a expressão do HER2 fraco e incompleto em menos de 10% das células tumorais, porém ainda com implicações clínicas a serem esclarecidas.

Os esforços para distinguir características clínicas entre o HER2-low e o HER2 negativo, até o momento, apresentam resultados conflitantes, em termos de diferenças de sobrevida e seu papel prognóstico. Porém há importante correlação com a expressão de receptores hormonais, e em casos de concomitância da expressão, ocorre diferenças na resposta quimioterápica, na remissão patológica completa, na quantidade de infiltrado leucocitário peritumoral. Não ocorre, até o dado momento, diferenças estatísticas unânimes no que diz respeito a sobrevida e tempo livre de doença e poucas informações estão disponíveis com relação a metástases a distância. (ALMSTEDT *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2022; COSIMO *et al.*, 2022; DOMERGUE *et al.*, 2022; ENDE *et al.*, 2022; GUVEN *et al.*, 2021; KANG *et al.*, 2022; MIGLIETTA *et al.*, 2022; MUTAI *et al.*, 2021; ROSSO *et al.*, 2022; SHAO *et al.*, 2022; AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESARCH, 2021)

Justificativa

A necessidade de estratificação de uma escala já bem descrita, e amplamente utilizada, é um dos pilares do processo de evolução científica, uma vez que surgem novos questionamentos direcionados àquela resposta que, hoje, já não é capaz de completar todas as lacunas de conhecimento.

O HER2, que já se mostrou um importante avanço no início dos anos 2000, novamente fica nos holofotes da ciência. A possibilidade de possuir novas classificações que não estão presentes nos *guidelines* atuais, e as expectativas das correlações com mudanças terapêuticas no tratamento de neoplasias de mama, são alguns dos motivos para este destaque.

Nota-se que os tumores que expressam o HER2 na categoria entendida como “low”, mantêm-se como neoplasias de mama com características clínicas

semelhantes àquelas conhecidas, com algumas discordâncias na literatura, porém com grandes expectativas a respeito de sua resposta a novos tratamentos farmacológicos, que antes eram desconsiderados nas neoplasias consideradas como triplo-negativas, onde esta categoria estava contida.

Ao considerar as possibilidades e contrastar com a atual literatura científica disponível, surge o questionamento: **qual a prevalência de casos considerados como HER2 negativo que poderiam ser incluídos na atual classificação de HER2-low, e quais diferentes desfechos estão representados nestes casos?**

Objetivo Geral:

Identificar casos passados classificados como HER2 negativos que hoje seriam considerados como HER2-low e HER2-ultra low e analisar os desfechos.

Objetivos específicos:

- Verificar a prevalência de HER2-low e HER2-ultra low em casos classificados anteriormente como HER2 negativos;
- Analisar características clinicopatológicas das pacientes com tumores HER2-low e ultra-low: idade no momento do diagnóstico, grau tumoral e estadiamento;
- Analisar desfechos clínicos como recidiva, óbito, sobrevida livre de doença e sobrevida total em pacientes com marcador HER2-low e ultra-low;
- Buscar diferenças entre os desfechos clínicos de casos classificados como HER2-low e ultra-low *versus* HER2 positivo usual.

Materiais e métodos

Serão analisadas amostras (blocos de parafina) de pacientes com carcinoma de mama, provenientes de estudo previamente aprovado pelo CEP-UFCSPA (Anexo I). Não haverá nova coleta de material. Gostaria de salientar que o

protocolo de pesquisa original “CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO” foi construído e aprovado nos termos das diretrizes e normativas vigentes no ano de 2010 (Resolução CNS 196/96). No TCLE (Anexo II), a paciente autoriza a utilização de informações clínicas e material biológico em estudos futuros. Embora não esteja especificado no TCLE, mas pode ser conferido no protocolo de pesquisa*, o estudo engloba análise histopatológica (lâminas HE) e imunohistoquímica de blocos de parafina e análises moleculares (DNA).

* O protocolo de pesquisa original será incluído na Plataforma Brasil juntamente com a documentação do projeto.

Critérios de Inclusão:

A partir do protocolo original anteriormente citado serão incluídas amostras de pacientes femininas com diagnóstico de câncer de mama, que concordaram em participar do estudo.

Critérios de exclusão:

Serão excluídas pacientes que não concordaram em participar do estudo e pacientes do sexo masculino.

Delineamento:

Estudo transversal

Tamanho amostral:

Serão reanalisadas 300 amostras (blocos de parafina) já classificadas para o marcador HER2 do banco de dados pré-existente, proveniente do estudo original, considerando-se os devidos poder e significância estatísticos.

Os blocos de parafina encontram-se armazenados sob a responsabilidade do pesquisador responsável, assim como o banco de dados com as informações clinicopatológicas previamente coletadas.

Local de realização da Pesquisa:

Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA.

Procedimentos experimentais:

Serão analisadas as informações já existentes no banco de dados considerando o marcador HER2. Os casos classificados como negativos (expressão 0, 1 e 2) serão reestudados, através de reação imunohistoquímica padrão do Laboratório de Patologia da UFCSPA, para possível classificação como HER2-low (escore 1+ e 2+). Os resultados serão comparados com dados clinicopatológicos presentes no banco de dados.

Análise Estatística:

Será constituído um banco no software Excel, contendo as variáveis em estudo. A normalidade dos diversos parâmetros em estudo será determinada pelo kolmogorov-Smirnov. Para comparar as variáveis com distribuição normal entre os grupos de estudo e controle, serão empregados o teste t de student e a ANOVA um critério. Para aquelas cuja distribuição não for normal serão empregados os testes U e análise de Kruskal Wallis. No estudo das correlações serão determinados os coeficientes de correlação de Pearson e Spearmann. O Nível de significância será de 5%.

Aspectos Éticos:

O presente estudo está em consonância com a Resolução 466/12 do CNS/MS. Não afetará de forma direta os indivíduos participantes, pois será realizada apenas análise de material previamente coletado em estudo anterior. O material encontra-se sob a responsabilidade do pesquisador responsável (Adriana Vial Roehe). Não haverá também discriminação na seleção dos indivíduos, nem a exposição dos mesmos a riscos desnecessários. Serão dadas garantias da preservação dos dados, da confidencialidade e do anonimato dos indivíduos pesquisados. Será assinado o Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD). Os dados já coletados serão somente utilizados para realização do protocolo da pesquisa, sendo que os Termos de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLEs) para participação da pesquisa já foram obtidos previamente e encontram-se de posse do pesquisador responsável (Anexo II).

Não serão necessárias novas coletas de material e nem de informações clínicas. O presente projeto não envolve a participação direta de indivíduos, somente de material previamente coletado.

Potenciais riscos: os riscos são mínimos, em função do que foi colocado acima. O maior risco em potencial seria a quebra de sigilo, no entanto os pesquisadores se comprometem nesse sentido apresentando assinatura do TCUD.

A pesquisa só será iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.

Orçamento:

Elementos de despesa	Valor
Eletrodo De Plástico Com Sonda De Temperatura. Ph 0-14 – 1un	R\$415,00
TELA C/ REFRATARIO 14X14 CM para bico de Bunsen – 1un	R\$27,00
BARRA MAGNETICA LISA 7 X 30 MM – 3un	R\$45,00
Microtubo De Centrifugação 2,0 ML. Transparente. 500 Un/pct. -6 un	R\$180,00
CASSETTE ABERTURA TRASEIRA, 30º, TAMPA E BASE, AZUL, PACOTE COM 500UND- 8un	R\$664,00
KIT COMPLETO EASYLINK DUO, POLÍMERO, 125ML COMPLETO, REF: MS 10039370003 – 1un	R\$5950,00
ADVANCED PAP PEN ref: Z672548-1EA – 5un	R\$3015,00
MICROBLADE, NAVALHA DESCARTÁVEL BAIXO PERFIL, 50 UND POR CAIXA – 2un	R\$1332,82
Total	R\$11508,82

O projeto será realizado com o auxílio do Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre que já possui infraestrutura, alguns insumos e equipamento adequado para a realização de reações dos anticorpos.

Cronograma

Etapas	Mês 1-5	Mês 6-10	Mês 11-14	Mês 15-17	Mês 18-20	Mês 21-24
Levantamento e revisão bibliográfica	X	X	X			
Coleta de dados e reações imunohistoquímicas		X	X			
Estratificação, tabulação e análise de dados			X	X		
Organização e redação do trabalho				X	X	
Revisão final e encaminhamento para publicação de artigo científico.					X	X
Apresentação da Dissertação						X

Referências

ALMSTEDT, Katrin; HEIMES, Anne-Sophie; KAPPENBERG, Franziska; BATTISTA, Marco J.; LEHR, Hans-Anton; KRAJNAK, Slavomir; LEBRECHT, Antje; GEHRMANN, Mathias; STEWEN, Kathrin; BRENNER, Walburgis. Long-term prognostic significance of HER2-low and HER2-zero in node-negative breast cancer. **European Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 173, p. 10-19, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2022.06.012>.

American Association For Cancer Research. HER2–Low Positive and HER2-Zero Breast Cancers Are Clinically Distinct. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 2124-2124, 1 set. 2021. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-rw2021-102>.

BANERJI, Udai; VAN HERPEN, Carla M L; SAURA, Cristina; THISTLETHWAITE, Fiona; LORD, Simon; MORENO, Victor; MACPHERSON, Iain R; BONI, Valentina; ROLFO, Christian; VRIES, Elisabeth G e de. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 1124-1135, ago. 2019. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30328-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30328-6).

CHEN, Mengdi; CHEN, Weilin; LIU, Deyue; CHEN, Weiguo; SHEN, Kunwei; WU, Jiayi; ZHU, Li. Prognostic values of clinical and molecular features in HER2 low-breast cancer with hormonal receptor overexpression: features of her2-low breast cancer. **Breast Cancer**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 844-853, 21 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-022-01364-y>.

COSIMO, Serena di; LAROCCA, Eliana; LJEVAR, Silva; SANTIS, Maria Carmen de; BINI, Marta; CAPPELLETTI, Vera; VALENTI, Marta; BAILI, Paolo; BRAUD, Filippo G. de; FOLLI, Secondo. Moving HER2-low breast cancer predictive and prognostic data from clinical trials into the real world. **Frontiers In Molecular Biosciences**, [S.L.], v. 9, p. 1-10, 26 set. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2022.996434>.

DESANTIS, Carol E.; BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; LORTET-TIEULENT, Joannie; ANDERSON, Benjamin O.; JEMAL, Ahmedin. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1495-1506, 30 set. 2015. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-15-0535>.

DOMERGUE, Camille; MARTIN, Elodie; LEMARIÉ, Camille; JÉZÉQUEL, Pascal; FRENEL, Jean-Sebastien; AUGEREAU, Paule; CAMPONE, Mario; PATSOURIS, Anne. Impact of HER2 Status on Pathological Response after Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer. **Cancers**,

[S.L.], v. 14, n. 10, p. 2509, 19 maio 2022. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/cancers14102509>.

GUVEN, Deniz Can; KAYA, Mehmet Burak; FEDAI, Burak; OZDEN, Mucahit; YILDIRIM, Hasan Cagri; KOSEMEHMETOGLU, Kemal; KERTMEN, Neyran; DIZDAR, Omer; UNER, Aysegul; AKSOY, Sercan. HER2-low breast cancer could be associated with an increased risk of brain metastasis. **International Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 332-339, 18 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10147-021-02049-w>.

KANG, Sora; LEE, So H.; LEE, Hee J.; JEONG, Hyehyun; JEONG, Jae H.; KIM, Jeong E.; AHN, Jin-Hee; JUNG, Kyung H.; GONG, Gyungyub; KIM, Hak H.. Pathological complete response, long-term outcomes, and recurrence patterns in HER2-low versus HER2-zero breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. **European Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 176, p. 30-40, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2022.08.031>.

KONONEN, Juha; BUBENDORF, Lukas; KALLIONIMENI, Anne; BÄRLUND, Maarit; SCHRAML, Peter; LEIGHTON, Stephen; TORHORST, Joachim; MIHATSCH, Michael J; SAUTER, Guido; KALLIONIMENI, Olli-P.. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 4, n. 7, p. 844-847, jul. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0798-844>.

MIGLIETTA, Federica; GRIGUOLO, Gaia; BOTTOSSO, Michele; GIARRATANO, Tommaso; LOMELE, Marcello; FASSAN, Matteo; CACCIATORE, Matilde; GENOVESI, Elisa; BARTOLO, Debora de; VERNACI, Grazia. HER2-low-positive breast cancer: evolution from primary tumor to residual disease after neoadjuvant treatment. **Npj Breast Cancer**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-5, 20 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41523-022-00434-w>.

MODI, Shanu; PARK, Haeseong; MURTHY, Rashmi K.; IWATA, Hiroji; TAMURA, Kenji; TSURUTANI, Junji; MORENO-ASPITIA, Alvaro; DOI, Toshihiko; SAGARA, Yasuaki; REDFERN, Charles. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: results from a phase ib study. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 38, n. 17, p. 1887-1896, 10 jun. 2020. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.19.02318>.

MUTAI, Raz; BARKAN, Tamar; MOORE, Assaf; SARFATY, Michal; SHOCHAT, Tzippy; YERUSHALMI, Rinat; STEMMER, Salomon M.; GOLDVASER, Hadar. Prognostic impact of HER2-low expression in hormone receptor positive early breast cancer. **The Breast**, [S.L.], v. 60, p. 62-69, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2021.08.016>.

PONDÉ, Noam; BRANDÃO, Mariana; EL-HACHEM, Georges; WERBROUCK, Emilie; PICCART, Martine. Treatment of advanced HER2-positive breast

cancer: 2018 and beyond. **Cancer Treatment Reviews**, [S.L.], v. 67, p. 10-20, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.016>.

ROSS, Js; FLETCHER, Ja. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. **American Journal Of Clinical Pathology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 53-67, jul. 1999.

ROSSO, Christopher; VOUTSADAKIS, Ioannis A.. Characteristics, Clinical Differences and Outcomes of Breast Cancer Patients with Negative or Low HER2 Expression. **Clinical Breast Cancer**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 391-397, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2022.02.008>.

SHAK S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. **Seminars in Oncology**, v. 4 n. 12, p 71-77, 26 ago. 1999.

SHAO, Yingbo; YU, Yang; LUO, Zhifen; GUAN, Huijuan; ZHU, Fangyuan; HE, Yaning; CHEN, Qi; LIU, Chaojun; NIE, Bing; LIU, Hui. Clinical, Pathological Complete Response, and Prognosis Characteristics of HER2-Low Breast Cancer in the Neoadjuvant Chemotherapy Setting: a retrospective analysis. **Annals Of Surgical Oncology**, [S.L.], v. 29, n. 13, p. 8026-8034, 6 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-022-12369-4>.

SHU, Lan; TONG, Yiwei; LI, Zhuoxuan; CHEN, Xiaosong; SHEN, Kunwei. Can HER2 1+ Breast Cancer Be Considered as HER2-Low Tumor? A Comparison of Clinicopathological Features, Quantitative HER2 mRNA Levels, and Prognosis among HER2-Negative Breast Cancer. **Cancers**, [S.L.], v. 14, n. 17, p. 4250, 31 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14174250>.

SIMON, Ronald; MIRLACHER, Martina; SAUTER, Guido. Tissue microarrays in cancer diagnosis. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 421-430, jul. 2003. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.3.4.421>.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

TARANTINO, Paolo; GANDINI, Sara; NICOLÒ, Eleonora; TRILLO, Pamela; GIUGLIANO, Federica; ZAGAMI, Paola; VIVANET, Grazia; BELLERBA, Federica; TRAPANI, Dario; MARRA, Antonio. Evolution of low HER2 expression between early and advanced-stage breast cancer. **European Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 163, p. 35-43, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2021.12.022>.

TARANTINO, Paolo; NIMAN, Samuel M.; ERICK, Timothy K.; PRIEDIGKEIT, Nolan; HARRISON, Beth T.; GIORDANO, Antonio; NAKHLIS, Faina; BELLON, Jennifer R.; PARKER, Tonia; STRAUSS, Sarah. HER2-low inflammatory breast cancer: clinicopathologic features and prognostic implications. **European Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 174, p. 277-286, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2022.07.001>.

VENETIS, Konstantinos; CRIMINI, Edoardo; SAJJADI, Elham; CORTI, Chiara; GUERINI-ROCCO, Elena; VIALE, Giuseppe; CURIGLIANO, Giuseppe; CRISCITIELLO, Carmen; FUSCO, Nicola. HER2 Low, Ultra-low, and Novel Complementary Biomarkers: expanding the spectrum of her2 positivity in breast cancer. **Frontiers In Molecular Biosciences**, [S.L.], v. 9, p. 11-16, 15 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2022.834651>.

VIALE, Giuseppe; FUSCO, Nicola. Pathology after neoadjuvant treatment – How to assess residual disease. **The Breast**, [S.L.], v. 62, p. 25-28, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2021.11.009>.

VIEIRA, Daniella Serafin Couto; DUFLOTH, Rozany Mucha; SCHMITT, Fernando Carlos Lander; ZEFERINO, Luiz Carlos. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Florianópolis, v. 1, n. 30, p. 42-47, ago. 2008.

WOLFF, Antonio C.; HAMMOND, M. Elizabeth Hale; ALLISON, Kimberly H.; HARVEY, Brittany E.; MANGU, Pamela B.; BARTLETT, John M.s.; BILOUS, Michael; ELLIS, Ian O.; FITZGIBBONS, Patrick; HANNA, Wedad. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: american society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline focused update. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 36, n. 20, p. 2105-2122, 10 jul. 2018. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2018.77.8738>.

WON, Hye Sung; AHN, Juneyoung; KIM, Yongseon; KIM, Jin Sung; SONG, Jeong-Yoon; KIM, Hong-Kyu; LEE, Jeeyeon; PARK, Heung Kyu; KIM, Yong-Seok. Clinical significance of HER2-low expression in early breast cancer: a nationwide study from the korean breast cancer society. **Breast Cancer Research**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 10-15, 21 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-022-01519-x>.

XU, Hangcheng; HAN, Yiqun; WU, Yun; WANG, Yan; LI, Qing; ZHANG, Pin; YUAN, Peng; LUO, Yang; FAN, Ying; CHEN, Shanshan. Clinicopathological Characteristics and Prognosis of HER2-Low Early-Stage Breast Cancer: a single-institution experience. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 12, p. 1-8, 16 jun. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.906011>.

ZHANG, Huina; KARAKAS, Cansu; TYBURSKI, Haley; TURNER, Bradley M; PENG, Yan; WANG, XI; KATERJI, Hani; SCHIFFHAUER, Linda; HICKS, David G. HER2-low breast cancers: current insights and future directions. **Seminars In Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 305-312, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2022.07.003>.

ZHANG, Huina; KATERJI, Hani; TURNER, Bradley M.; AUDEH, William; HICKS, David G.. HER2-low breast cancers: incidence, her2 staining patterns, clinicopathologic features, mammaprint and blueprint genomic profiles. **Modern Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 1075-1082, 19 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-022-01019-5>.

ZHANG, Huina; KATERJI, Hani; TURNER, Bradley M; HICKS, David G. HER2-Low Breast Cancers. **American Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 157, n. 3, p. 328-336, 14 set. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/aqab117>.

Anexo I – Parecer CEP UFCSPA projeto anterior



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFCSPA

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

Projeto: 10-641

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

ADRIANA ROEHE

GRASIELA AGNES

CARMELA NICOLINI

BRUNA PEIXOTO DE SOUZA

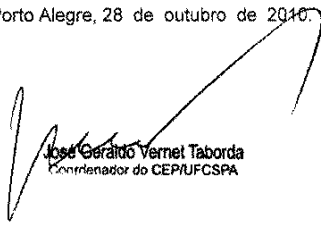
TALITA HAUBERT CERUTTI

CLÁUDIO OSMAR PEREIRA ALEXANDRE

Título: CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO,

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP".

Porto Alegre, 28 de outubro de 2010.


José Geraldo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/UFCSPA

Anexo II – TCLE referente ao projeto do Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO

Este texto foi feito para explicar a você um estudo científico que está sendo desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde e no Grupo Hospitalar Conceição (Hospital Fêmina). O texto serve para explicar a você o que será realizado neste estudo. Este trabalho só será iniciado após a aprovação pelos Comitê de Ética em Pesquisa das duas instituições: Universidade Federal de Ciências da Saúde e Grupo Hospitalar Conceição.

As causas dos tumores malignos de mama ainda não são totalmente conhecidas. Sabe-se que existem fatores genéticos associados, principalmente quando ocorrem em pacientes jovens. O objetivo deste estudo é avaliar se houve um aumento no número de pessoas com menos de 40 afetadas pela doença e se estas pessoas possuem fatores de risco diferentes em relação a pessoas mais velhas. Além disto, este estudo irá avaliar se estas pessoas possuem tumores mais avançados no momento do diagnóstico, se eles respondem pior ao tratamento e se eles têm características clínicas e biológicas próprias e diferentes dos tumores de mama que ocorrem em mulheres mais velhas.

A participação neste estudo é voluntária e não implica em qualquer diferença na sua cirurgia e no seu tratamento. Iremos coletar uma amostra de 3 mililitros de sangue venoso para estudo, através da punção de veia, para fazermos análises genéticas, neste estudo e em estudos futuros. Você também responderá a um questionário sobre fatores de risco para câncer e nos autorizará a revisar dados do seu prontuário médico, referentes à sua doença.

Não há qualquer risco extra para você e a participação no estudo não alterará de forma alguma seu tratamento. Você terá acesso a todos os resultados de seus testes e não haverá qualquer custo financeiro adicional.

A recusa em participar do estudo em nada afetará sua assistência médica. Em caso de divulgação científica dos resultados deste estudo, não haverá qualquer identificação individual, sendo garantido sigilo e anonimato dos pacientes participantes. Caso tiver novas perguntas sobre

este estudo, posso chamar a Dra. Adriana Vial Roehe (pesquisadora responsável) no telefone 33038723, ou no endereço Av. Sarmiento Leite nº 245, sala 10, para qualquer pergunta sobre os meus direitos com participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar a Dra. Andrea Souto Damin, no telefone, 33145223, (pesquisadora participante), ou o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, na Av. Sarmiento Leite, 245, Anexo 1, Pós-Graduação, telefone 33038804. Finalmente, se você concordar em participar do estudo preencha e assine a declaração a seguir:

Eu, ...(paciente ou responsável) fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Também fui informada que responderei a um questionário e que será revisado o meu prontuário e que todos estes dados serão mantidos confidenciais. Recebi informação detalhada a respeito do tratamento e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar. Fui também informada que caso existam custos adicionais, decorrentes diretamente da pesquisa, estes serão absorvidos pelo orçamento da mesma. Sei que a qualquer momento me recusar a participar da pesquisa sem qualquer prejuízo ao meu tratamento.

A Dra. Andréa Damin certificou-me de que, em caso de publicação dos resultados da pesquisa, será preservada a confidencialidade de minha identidade, bem como o tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei a liberdade de retirar o meu consentimento de participação na pesquisa em qualquer momento

Qualquer dúvida ética poderei entrar em contado com o Comitê de Ética em Pesquisa da Ufcsa, pelo telefone 33038804, ou do GHC pelo telefone 33572407.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do paciente

Data __/__/__

Nome:

Assinatura do pesquisador

Data __/__/__

Nome:

Este formulário foi lido para _____ em __/__/__ pelo _____
enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha

Data __/__/__

Nome:

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



Priscila da Trindade Flores

**Estudo do perfil alimentar e imunológico
de atletas soropositivos para SARS-CoV-2**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2022

Priscila da Trindade Flores

Estudo do perfil alimentar e imunológico de atletas soropositivos para SARS-CoV-2

Projeto de tese submetido ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Doutor

Orientadora: Dr^a Alessandra Peres

**Porto Alegre
2022**

DADOS PESSOAIS DOS PESQUISADORES

Coordenadora geral do estudo: Profª Dra. Alessandra Peres

Local de trabalho: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA - Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170.

Telefone: (51) 999619331 E-mail: aleimuno@hotmail.com

Pesquisadora: Priscila da Trindade Flores

Doutoranda: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Telefone: (55) 991344971 E-mail: prisciladatrindeflores@gmail.com

Vigência: setembro/2021 a setembro/2025

Agenda 2030:

ODS 3: Saúde e bem-estar

ODS 12: Consumo e produção responsáveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO E EXERCÍCIO FÍSICO	10
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SARS-COV-2	12
1.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CORRIDA	13
2. PROBLEMA DE PESQUISA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. HIPOTÉSES	15
5. JUSTIFICATIVA	16
6. METODOLOGIA	17
6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	17
6.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	17
6.3 CÁLCULO AMOSTRAL	17
6.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
6.4.1 Critérios de Inclusão	18
6.4.2 Critérios de Exclusão	18
6.5 INSTRUMENTO DE PESQUISA	18
6.5.1 Ficha de Anamnese	18
6.5.2 Avaliação Antropométrica	19
6.5.3 Avaliação do Consumo Alimentar	19
6.5.4 Coletas Sanguínea e Análises Bioquímicas	20
6.5.4.1 Imunoensaios enzimáticos	20
6.5.4.2 Imunofenotipagem	21
6.5.4.3 Ensaios de citotoxicidade e degranulação de células nk	21
6.5.4.4 Avaliação do conteúdo mitocondrial e do estado de polarização mitocondrial	22
6.5.4.5 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio em células nk e linfócitos T	22
6.5.4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (rmn de 1h)	22
6.5.4.7 Cultura celular com as linhas mcf-7, pc-3 e pnt1a	23
6.5.4.8 Ensaio cometa	23
6.5.5 CONTROLE DE CARGA E INTENSIDADE DE TREINAMENTO	24
6.5.6 QUALIDADE DE VIDA	24
6.5.7 COLETA SALIVAR	24
6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6.7 RISCOS E BENEFÍCIOS	25
6.8 CONDUTA ÉTICA	25

6.9 DESCARTE DE RESÍDUOS.....	26
6.10 CRONOGRAMA	26
7. ORÇAMENTO	28
8. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS	30
9. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	31
ANEXO A - QUESTIONÁRIO DE RASTREAMENTO METABÓLICO	34
ANEXO B- QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)	36
ANEXO C - QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA (<i>SHORT-FORM HEALTH SURVEY</i> (SF-36)	44
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	43
APÊNDICE B - ENTREVISTA ESTRUTURADA E FICHA DE AVALIAÇÃO	47
APÊNDICE C - REGISTRO ALIMENTAR – INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO	49
APÊNDICE D – REGISTRO DE ATIVIDADES FÍSICAS DIÁRIAS	52

RESUMO

A pandemia da COVID-19 provoca alterações temporárias e permanentes na saúde dos indivíduos infectados pelo Sars-CoV-2. A preocupação relacionada aos atletas refere-se à segurança para a realização da atividade física sem que ocorram riscos de novas infecções, principalmente virais. Compreender através da comparação entre atletas soropositivos para Sars-CoV-2 com atletas soronegativos o impacto no fenótipo de células imunes, perfil de citocinas sistêmico, bem como função de células imunológicas. A amostra do estudo será de atletas e indivíduos não atletas, que testaram positivo e negativo para COVID-19, maiores de 18 até 40 anos. As coletas serão realizadas em intervalos regulares de 3 meses após a entrada no estudo por um período de 12 meses. Serão realizadas anamnese com dados sociodemográficos e de saúde, rastreamento metabólico, qualidade de vida, avaliação antropométrica e consumo alimentar. Haverá avaliação dos volumes e intensidades de exercícios físicos dos atletas investigados; presença de anticorpos no plasma de atletas soropositivos ou negativos para SARS-CoV-2 através da titulação de anticorpos IgG e IgM para o nucleocapsídeo e proteína Spike; quantificação das concentrações circulantes de IgA, cortisol, testosterona, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10; imunofenotipagem de células T CD4+, CD8+, células NK quanto a marcadores de imunoregulação, exaustão e memória imunológica; avaliação da atividade citotóxica de células PBMC em ensaios de citotoxicidade e degranulação; verificação do perfil metabólico sistêmico e ainda será realizada a cultura celular com suplementação do plasma para verificar o comportamento das linhagens MCF-7, PC-3 e PNT1A, ensaio cometa e coleta salivar. Este projeto apresenta grande potencial na geração de estudos científicos que possam contribuir de forma significativa para a compreensão do comportamento imunológico em atletas que desenvolveram resposta para Sars-CoV-2. A partir destes dados, aprimorar o acompanhamento de alterações inflamatórias induzidas pelo exercício além de avaliar o impacto da infecção por Sars-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; metabolismo; inflamação; treinamento físico

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic causes temporary and permanent changes in the health of individuals infected with Sars-CoV-2. The concern related to athletes refers to the safety to perform physical activity without the risk of new infections, especially viral. To understand by comparing Sars-CoV-2 seropositive athletes with seronegative athletes the impact on immune cell phenotype, systemic cytokine profile, as well as immune cell function. The study sample will consist of athletes and non-athletes who tested positive and negative for COVID-19, over 18 to 40 years. Collections will be performed at regular 3-month intervals after entry into the study for a period of 12 months. Anamnesis will be carried out with sociodemographic and health data, metabolic tracking, quality of life, anthropometric and food consumption assessment. There will be an evaluation of the volumes and intensities of physical exercises of the investigated athletes; presence of antibodies in the plasma of seropositive or negative for SARS-CoV-2 through the titration of IgG and IgM antibodies to nucleocapsid and Spike protein; quantification of circulating concentrations of IgA, cortisol, testosterone, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10; immunophenotyping of CD4+, CD8+ T cells, NK cells for markers of immunoregulation, exhaustion and immune memory; evaluation of the cytotoxic activity of PBMC cells in cytotoxicity and degranulation assays; verification of the systemic metabolomic profile and cell culture will be performed with plasma supplementation to verify the behavior of the MCF-7, PC-3 and PNT1A strains, comet assay and salivary collection. This project has great potential in generating scientific studies that can significantly contribute to the understanding of immunological behavior in athletes who developed a response to Sars-CoV-2. From these data, to improve the monitoring of inflammatory changes induced by exercise in addition to evaluating the impact of Sars-CoV-2 infection.

Keywords: COVID-19; Metabolism; Inflammation; Physical training

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: agência nacional de vigilância sanitária

ANOVA: análise de variância AP

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IID - Índice de Inflamação da Dieta

IgA: imunoglobulina A

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

IFN- γ : interterferon gama

MCP1: proteína quimiotática de monócitos 1

NK: células natural Killers

PCR : proteína C reativa

QV: qualidade de vida

SPSS: software de estatística

TC: termo de confidencialidade

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β : fator de crescimento beta

TLR: receptores toll-like

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde

VEGF: fator de crescimento de vasos endoteliais

RESUMO LEIGO

O projeto visa verificar os efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica de atletas, compreender se há correlação entre volume de treinamento físico e propensão a infecções e verificar um possível impacto da COVID-19 no sistema imunológico dos atletas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO E EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico é considerado um dos principais componentes de uma vida saudável. Além das funções relacionadas à prevenção do excesso de peso corporal, inflamação sistêmica e doenças crônicas não transmissíveis, sugere-se um potencial benéfico do exercício físico na redução de doenças transmissíveis, incluindo patologias virais¹.

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 imune².

A ativação da resposta imune pode resultar na liberação de fatores pró (interleucina 1 (IL1), interleucina 8 (IL8), TNF alfa (TNF- α), fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF)) e anti-inflamatórios (interleucina 4 (IL4), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL13)). A prática de exercício físico constante favorece a permanência de um status anti-inflamatórios nos indivíduos o que tem sido fortemente debatido como uma excelente alternativa não farmacológica para o tratamento de doenças crônicas como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares³.

Além dos fatores solúveis são observadas alterações celulares como por exemplo nas células T reguladoras CD4+, CD25+, CD127-, FoxP3+ as quais regulam respostas inflamatórias através da secreção de IL-10 e TGF- β . Estas células são estimuladas através da realização de exercício e sua ação se estende a monócitos, células dendríticas, células T CD4 e CD8 assim como as células Natural Killers (NK)⁴.

A atividade física tem um impacto positivo no peso, pressão arterial e glicose, dislipidemia, desejo por cigarro, ansiedade, depressão e inflamação sistêmica. Além disso, também promove melhora a resposta imunológica às vacinas e diminui a duração e a gravidade da doença viral, principalmente por meio do aumento dos níveis de citocinas antiinflamatórias (por exemplo, IL-10, antagonista do receptor de

interleucina-1) e através da regulação negativa da expressão/ativação de receptores toll-like (TLRs)⁵.

Tem sido demonstrada a relação do exercício com a melhora de pacientes acometidos por câncer e mesmo na prevenção para o desenvolvimento da doença^{6,7}. A realização de uma sessão de treino é capaz de mobilizar leucócitos com melhora na capacidade funcional destas células. Existem teorias de que o exercício é capaz de melhorar a resposta dos pacientes a imunoterapia incluindo inibidores de checkpoints⁸.

Porém a hipótese da “janela-aberta” sugere que a prática de exercício físico extenuante aumenta o risco de infecções do trato respiratório superior. Esta prática está relacionada com diferentes intensidades e volumes de treino sobre os sistemas². Essa teoria significa que há uma “janela aberta” de imunidade alterada (que pode durar entre 3 e 72 horas) na qual o risco de infecção clínica após o exercício é excessivo⁹. Nesse caso, doses moderadas poderiam ser benéficas para a resposta imunológica quando praticadas a longo prazo, porém a prática extenuante poderia causar um desequilíbrio na homeostasia imunológica proporcionando a suscetibilidade para infecções².

O exercício pode induzir também alterações hormonais, como níveis aumentados de cortisol. Essas mudanças são descritas como mediadoras da imunossupressão após a sessão de treinamento¹⁰. Esse impacto do exercício é associado à ocorrência de infecções das vias aéreas superiores¹¹. Doenças respiratórias podem ter um impacto negativo na saúde e no desempenho de atletas que realizam altos níveis de exercícios extenuantes. A doença respiratória superior é o motivo mais comum de apresentações lesões não relacionadas à medicina esportiva, respondendo por 35-65% das apresentações de doenças¹².

Outro ponto determinante para integridade do sistema imunológico é a nutrição, estudos que mostram que a nutrição inadequada ou inapropriada, para tais características específicas do treinamento e do atleta, pode agravar o esforço consequentemente a resposta imunológica. Uma ingestão adequada de micronutrientes, aminoácidos, macronutrientes e fitoterápicos específicos são importantes para a manutenção da função imune, em contrapartida a ingestão excessiva de alguns micronutrientes podem causar toxicidade ao organismo o que

levaria a efeitos adversos sobre a saúde e até mesmo a alteração da adaptação da resposta ao treinamento¹³.

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SARS-COV-2

A pandemia da COVID-19 provoca alterações temporárias e permanentes na saúde dos indivíduos infectados pelo Sars-CoV-2. Acredita-se que grande parte da doença crítica associada à infecção por SARS-CoV-2 seja o resultado de um processo hiperinflamatório conhecido como hipercitocinemia ou uma “tempestade de citocinas”¹⁴.

A tempestade de citocinas é uma resposta hiperinflamatória aguda que pode ser responsável por doenças críticas em muitas condições, incluindo infecções virais, câncer, sepse e falência de múltiplos órgãos. A tempestade de citocinas provoca aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, e IFN- γ e baixos níveis de citocinas relacionados ao padrão anti-inflamatório como a IL-4 são observados nos pacientes. Também parece existir uma relação da gravidade do paciente com maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias¹⁵.

O fenômeno foi implicado em pacientes gravemente enfermos infectados com SARS-CoV-2. Acredita-se que os pacientes com COVID-19 criticamente enfermos com tempestade de citocinas tenham um pior prognóstico e aumento da taxa de letalidade. Em pacientes infectados com SARS-CoV-2, a tempestade de citocinas parece importante para a patogênese de várias manifestações graves de COVID-19: síndrome do desconforto respiratório agudo, doenças tromboembólicas, como acidente vascular cerebral isquêmico agudo causado por oclusão de grandes vasos e infarto do miocárdio, encefalite, rim agudo prejuízo, e vasculite (síndrome do tipo Kawasaki em crianças e vasculite renal em adultos¹⁴.

O exercício físico tem efeitos antiinflamatórios importantes para atenuar não apenas a inflamação, mas também a inflamação sistêmica geral, observada em populações fisicamente inativas e obesas. As citocinas liberadas pela contração dos músculos esqueléticos (“miocinas”) tem efeitos antiinflamatórios locais e pleiotrópicos, imunorreguladores e de promoção da saúde. IL-7 e IL-15, que são fatores proliferativos de linfócitos, são liberados durante o exercício, apoiando a

função e a proliferação de células imunes, principalmente células T virgens. A IL-15 também é essencial para manter as células T CD8+ de memória e a ativação, produção e citotoxicidade das células NK, tornando-se um fator importante na estimulação das respostas imunológicas às infecções¹⁶.

A preocupação relacionada aos atletas refere-se à segurança para a realização da atividade física sem que ocorram riscos de novas infecções, principalmente virais. Ainda não está bem claro o tempo necessário para que ocorra a recuperação do desequilíbrio imunológico provocado pelo vírus. Até o momento atletas que tiveram contato com o vírus reportam sintomas residuais por várias semanas e meses tais como tosse, fadiga extrema bem como taquicardia¹⁷.

O controle da produção de estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS), que produzem dano celular, é modulado pela prática de atividade física por dois mecanismos, a inibição do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a estimulação das vias do fator nuclear eritroide 2 (Nrf2). O exercício pode ativar as vias de sinalização antiinflamatórias que podem ser relevantes na atenuação dos sintomas da COVID-19. O treinamento físico pode melhorar rotas alternativas de produção de óxido nítrico (ON), estimulação da expressão endotelial do óxido nítrico endotelial (eNOS), modulação do estresse oxidativo com efeitos antivirais e recuperação pulmonar pós-infecção de COVID-19. A implementação de atividade física é uma ferramenta complementar útil para a prevenção, aumentando a recuperação, melhorando a qualidade de vida e fornecendo proteção imunológica no longo prazo¹⁸.

1.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CORRIDA

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 adeptos¹⁹. 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 adeptos²⁰.

Os exercícios aeróbicos melhoram a função do sistema imunológico, aumentando o nível e a função dos linfócitos T, neutrófilos, macrófagos e monócitos, que são elementos essenciais na defesa do corpo contra infecções, aumentando os níveis de imunoglobulinas “IgA, IgM, IgG”, particularmente IgA e IgG por causa de seu papel vital nas infecções pulmonares, regulando os níveis de proteína C reativa, através da produção de um pequeno aumento de curto prazo para combater os vírus pulmonares e uma diminuição de longo prazo para prevenir qualquer queda nas funções pulmonares e diminuir a ansiedade e depressão para melhorar a imunidade por meio do reequilíbrio da relação T-helper 1 / T-helper 2²¹.

Estudos indicam que exercícios aeróbicos de intensidade moderada diminuam a gravidade e a progressão dos distúrbios associados ao COVID-19 e melhora da qualidade de vida. Além disso, duas semanas de exercícios aeróbicos produziram um efeito positivo no sistema imunológico, aumentando as quantidades de leucócitos, linfócitos, imunoglobulina. Essa prática pode ajudar clinicamente a melhorar as funções imunológicas, o que pode levar a uma diminuição no custo da hospitalização. Além disso, ajuda a aumentar a eficácia das vacinas COVID-19, devido ao aumento das funções imunológicas. O exercício físico ajuda a diminuir o sofrimento de pacientes com COVID-19, diminuindo seus distúrbios associados e taxas de mortalidade²².

O padrão de resposta imunológica desencadeada por COVID-19 grave permanece notavelmente distinto das alterações imunológicas induzidas por outras infecções virais ou uma tempestade de citocinas²³. 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 a infecções de mucosas e sistema respiratório bem como na qualidade de vida. 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.

2 PROBLEMA DE PESQUISA

Qual o impacto da infecção por Sars-CoV-2 no perfil inflamatório de atletas?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender através da comparação entre atletas soropositivos para Sars-CoV-2 com atletas soronegativos o impacto no fenótipo de células imunes, perfil de citocinas sistêmico, bem como função de células imunológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença anticorpos para SARS Cov-2
- Conhecer o impacto no fenótipo e atividades celulares de linfócitos T e células NK
- Avaliar a capacidade de produção de citocinas por PBMC in vitro,
- Avaliar o consumo alimentar através do Índice de Inflamação da Dieta (IID)
- Avaliar a composição corporal dos atletas,
- Avaliar a qualidade de vida dos atletas
- Verificar a relação do perfil alimentar e de suplementação, bem como da intensidade do exercício com os índices inflamatórios dos atletas e composição corporal.
- Avaliar a relação do perfil imunológico ao IID em atletas com diagnóstico soropositivo para sars-cov-2,
- Avaliar a relação do dano ao DNA e IID em atletas com diagnóstico soropositivo para sars-cov-2,
- Avaliar a relação da qualidade de vida ao perfil inflamatório e IID em atletas.

4 HIPÓTESES

A hipótese da “janela-aberta” sugere que a prática de exercício físico extenuante aumenta o risco de infecções do trato respiratório superior². A pandemia da COVID-19 provoca uma tempestade de citocinas são observadas nos pacientes. Também parece existir uma relação da gravidade do sujeito com maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias¹⁵. A preocupação relacionada aos atletas

refere-se à segurança para a realização da atividade física sem que ocorram riscos de novas infecções, principalmente virais.

5 JUSTIFICATIVA

Este estudo visa compreender os efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica desses indivíduos, bem como compreender se há correlação entre volume de treinamento físico e propensão a infecções de mucosas e sistema respiratório bem como na qualidade de vida. 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.

6 METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Projeto de pesquisa classificado em estudo observacional que utilizará amostras sanguíneas, aplicação de questionários e dados clínicos pertencentes a população de estudo.

6.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Para a realização do estudo, serão recrutados atletas (nível competitivo nacional e internacional) e indivíduos não atletas, que testaram positivo ou negativo para COVID-19, maiores de 18 até 40 anos, que aceitem fazer parte do estudo, deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os participantes serão recrutados através de contato com assessorias esportivas, cartaz digital e carta à universidade. Participarão todos aqueles que entregarem o TCLE (APÊNDICE A) e se enquadrarem nos critérios de inclusão.

6.3 CÁLCULO AMOSTRAL

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 cortisol²⁴, 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 88 participantes.

6.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os participantes serão divididos em 4 grupos de 21 atletas cada:

- 1) Atletas soropositivo para SARS-CoV-2,
- 2) Atletas soronegativo para SARS-CoV-2,
- 3) sujeitos não atletas soropositivos para SARS-CoV-2 e
- 4) sujeitos não atletas soronegativos para SARS-CoV-2.

As coletas serão realizadas em intervalos regulares de 3 meses após a entrada no estudo por um período de 12 meses.

6.4.1 Critérios de Inclusão:

- Ter idade superior a 18 anos e inferior a 50 anos;
- Concordar e assinar o TCLE
- Alfabetizadas
- Praticar exercício físico de forma contínua a mais de 6 meses
- Praticar exercício físico pelo menos 150 minutos semanal;
- Corredores de longa distância (10 Km ou mais)

6.4.2 Critérios de Exclusão:

- Ter realizado procedimento cirúrgico nos últimos seis meses;
- Ter menos de 18 anos;
- IMC ≥ 25
- Gravidez;
- Fumar;
- Doença inflamatória aguda e/ou presença de infecção;
- Doença gengival ou periodontal;
- Fazer uso de anti-inflamatório no momento do estudo;
- Ter tido qualquer tipo de lesão na última semana pré coleta.

6.5 INSTRUMENTOS DE PESQUISA

6.5.1 Ficha de anamnese

A ficha para coleta de dados (APÊNDICE B) será preenchida pelo próprio pesquisador, durante entrevista com o avaliado antes da antropometria. A anamnese será composta por dados de identificação, socioeconômicos e de saúde do avaliado. E na sequência será realizado o questionário de rastreamento metabólico (ANEXO A)

6.5.2 Avaliação antropométrica

Na coleta de dados antropométricos serão utilizados os seguintes equipamentos: balança científica com estadiômetro acoplado da marca Filizola®, com capacidade de 150Kg e precisão de 100g para aferição de peso e estatura, para coleta das pregas cutâneas adipômetro científico da marca Cescorf® com sensibilidade 0,1mm e amplitude de leitura 88mm. Para a avaliação antropométrica serão utilizados os dados de peso corporal (kg), estatura (m).

Para avaliação da composição corporal dos homens será utilizado o somatório de sete dobras cutâneas ($\Sigma 7DC$) (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdominal + coxa medial), através da equação preditiva de densidade corporal e porcentagem de gordura para homens atletas de 18 a 61 anos de Jackson e Pollock (1978)²⁵: Densidade corporal (DC) (g/cm^3) = $1,112 - 0,00043499$ (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdome + coxa medial) + $0,0000055$ (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdome + coxa medial)² - $0,00028826$ (idade). E para as mulheres Jackson, Pollock e Ward (1980)²⁶ Densidade corporal (DC) (g/cm^3) = $1,097 - 0,00046971$ (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdome + coxa medial)² - $0,00012828$ (idade em anos). O percentual de gordura será calculado utilizando-se a equação de SIRI (1961)²⁷, representada pela seguinte fórmula: % Gordura = $[(4,95/DC) - 4,50] \times 100$.

6.5.3 Avaliação do consumo alimentar

Para avaliar a ingestão dietética quantitativamente será utilizado o registro alimentar de três dias não consecutivos (APÊNDICE B), sendo um deles final de semana. No registro alimentar o indivíduo deve anotar todos os alimentos ingeridos e suplementos utilizados com sua respectiva quantidade em medidas caseiras ou gramagem. As medidas caseiras serão convertidas em gramas segundo manual de Fisberg e Villar (2002)²⁸. O registro será calculado através do software Diet Win®. Será aplicado o Questionário de frequência alimentar para população brasileira (QFA)²⁹(ANEXO B). O cálculo do Índice de Inflamação da Dieta (IID) será calculado,

conforme descrito por Shivappa et al (2014)³⁰, para cada indivíduo, a partir da soma dos escores de cada componente alimentar e nutriente específico.

6.5.4 Coletas sanguínea e análises bioquímicas

Serão coletadas amostras sanguíneas dos participantes dos estudos. Os participantes estarão na posição sentada e as amostras serão coletadas individualmente por pessoas capacitadas. As coletas sanguíneas serão realizadas em intervalos regulares de 3 meses após a entrada no estudo por um período de 12 meses. As coletas serão realizadas na sala de coleta do Laboratório de Análises Clínicas da UFCSPA. Todo o procedimento será realizado obedecendo às normas de biossegurança para material biológico.

Serão coletados 20mL de sangue venoso através de punção na veia antecubital dos participantes em tubos sem anticoagulante (4mL) ou tubos contendo EDTA (16 mL). Os tubos sem anticoagulantes serão centrifugados por 10 minutos em uma rotação de 4000 rpm para obtenção do soro, ao qual será aliquoteado e congelado a -20°C para posteriores análises. Os tubos com anticoagulantes serão centrifugados por 10 minutos em uma rotação de 4000 rpm para obtenção do plasma, ao qual será aliquoteado e congelado a -20°C para posteriores análises.

O sangue coletado em tubos contendo EDTA será utilizado para obtenção de células mononucleares periféricas através do gradiente de concentração utilizando-se Ficoll Histopaque 1077 conforme descrito por Bicalho et al (1981)³¹. A viabilidade celular deverá ser >98% determinada pela contagem em câmara de Neubauer com azul trypan e o volume celular será ajustado de acordo com as necessidades para imunofenotipagem (1×10^7 células/mL) e estimulação celular para secreção de citocinas (1.5×10^5 células/mL).

6.5.4.1 Imunoensaios enzimáticos

Para observar o estado inflamatório dos participantes, a concentração plasmática de IgA, cortisol, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10 serão medidos pelo método

LUMINEX obtido na Pensabio®, Brasil, de acordo com as instruções do fabricante. Anticorpos IgA e IgG para o nucleocapsídeo e a proteína Spike do SARS-CoV-2 serão titulados por ensaios de ELISA.

6.5.4.2 Imunofenotipagem

Serão marcadas com anticorpos monoclonais, onde 1×10^6 células/mL, com diferentes fluorocromos CD3+, CD4+, CD8, CD16, CD56, CD25, CD127, HLA-DR, CD27, CD28, CD57, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG3, KLRG1 em um procedimento de marcação de seis cores associados a fluorocromos específicos. A expressão intracelular de NF- κ B será avaliada em células T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+. Apoptose será avaliação através de Anexina-V-PI. Os dados de imunofenotipagem serão adquiridos utilizando CELLquest Pro Software (BD Bioscience, San Jose, USA) em um citômetro de fluxo FACSCanto II.

6.5.4.3 Ensaios de citotoxicidade e degranulação de células NK

As células serão cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, a 37 ° C com 5% de CO₂. Em seguida, PBMC serão co-cultivados com células-alvo K562 e incubadas por 4h a 37°C, as células serão lavadas e coradas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD56 para quantificar o número de células NK. Após uma lavagem final, iodeto de propídio (PI) será adicionado e os números de células NK. A citotoxicidade das células NK será quantificada como a porcentagem de lise específica (% lise total - % morte celular espontânea). A avaliação da expressão intracelular de granzima e perforina nos subconjuntos de células NK CD56dim e CD56bright será realizada. Os fenótipos das células NK expressando CD107a (para desgranulação) e IFN- γ serão resolvidos por citometria de fluxo. Monensina, anti-CD107a e brefeldina A serão adicionados a cada poço. Após uma incubação de 4 horas, as células serão colhidas da placa e pipetadas para tubos FACS. As células serão lavadas e ressuspensas em PBS. As células em cada tubo são então coradas com anti - CD56, anti - CD3 e anti - NKG2C. Além disso, as células são então lisadas, permeabilizadas e coradas com anti - IFN - γ e analisadas por citometria de fluxo.

6.5.4.4 Avaliação do conteúdo mitocondrial e do estado de polarização mitocondrial

As células obtidas do sangue periférico dos atletas serão incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 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.

6.5.4.5 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio em células NK e linfócitos T

Serão avaliadas através do reagente MitoSox™ (por citometria de fluxo com excitação/emissão em 510/580).

6.5.4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H)

Será realizada em espectrômetro de 600 MHz, Varian Inova, equipado com uma sonda tripla de frio. Um total de 256 varreduras será coletado, com um tempo de aquisição de 4 segundos e intervalos de retardo de relaxamento entre as varreduras de 1,5 s. Após a aquisição de todo o espectro, o ajuste de fase, correção da linha de base, calibração espectral e quantificação serão realizados pelo software Chenomx NMR Suite 7.6. Serão realizadas análises estatísticas multivariadas para análise dos dados espectrais, como análise de componentes principais (PCA), e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Será realizada a análise dos dados no software MetaboAnalyst 3.0.

O PCA será aplicado para examinar a diferenciação no perfil metabólico geral entre as mudanças durante o tempo de acompanhamento dos atletas. Em seguida, o PLS-DA será conduzido para classificar a segregação do grupo e identificar os metabólitos mais importantes para explicar as mudanças no perfil metabólico entre os grupos. Metabólitos com importância variável para projeção (VIP) maior > 1,0 serão classificados como os metabólitos mais importantes na segregação do modelo.

Modelos PLS-DA reduzidos serão testados, com esses metabólitos, até que seja obtido um modelo com maior capacidade preditiva utilizando o menor número possível de variáveis. A robustez e qualidade dos modelos serão relatadas por testes de permutação (cem permutações) e validação cruzada (R²_Y e Q²).

6.5.4.7 Cultura celular com as linhas MCF-7, PC-3 e PNT1A

Estas células serão cultivadas a 37°C com 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 suplementado com kanamicina 0,5 mg/mL e 10% de soro bovino fetal (SBF). O plasma coletado dos atletas será utilizado na suplementação das culturas e as análises serão realizadas no sobrenadante das culturas.

6.5.4.8 Ensaio Cometa

O ensaio cometa será realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue será coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados. As células do sangue (alíquotas de 5 µL) serão embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115 µL) e a mistura será adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas serão cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas serão incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, será realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 30v e 300mA por 35 minutos. Todas estas etapas serão realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas serão neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA será corado Syber Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise. Um total de 100 células por indivíduo (50 células por duplicata) serão analisadas usando o sistema de análise de

imagem semi-automatizado Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). As análises microscópicas serão realizadas em um microscópio de fluorescência (Eclipse E400, Nikon Instruments, Japão), com objetiva de 40X. A porcentagem de DNA na cauda do cometa (% TDNA) será o parâmetro usado para avaliar o dano do DNA.

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Serão utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas serão codificadas para análise às cegas.

6.5.5 CONTROLE DE CARGA E INTENSIDADE DE TREINAMENTO

Será realizado um diário que será disponibilizado para que cada sujeito indique características das sessões diárias de treinamento ((APÊNDICE C). Desta forma, anotações quanto ao volume de exercício (em forma de quilômetros percorridos em cada sessão), intensidade (através do percentual da frequência cardíaca máxima), frequência semanal de treinos e percepção subjetiva de esforço com base na Escala de Borg³².

6.5.6 QUALIDADE DE VIDA

A qualidade de vida será avaliada por meio do questionário *Short-Form Health Survey* (SF-36), traduzido e validado no Brasil³⁵. Este, contém 36 itens divididos em oito perfis que detectam o estado de saúde do paciente, subdivididos em componentes de saúde física (capacidade funcional, aspectos físicos, dor e estado geral de saúde) e mental (vitalidade, aspectos sociais, aspecto emocional e saúde mental). As pontuações foram ponderadas individualmente para cada domínio e combinados das médias de componente de saúde física e componente de saúde mental. A pontuação é feita através de em uma escala de 0 a 100, e quanto maior o escore, melhor a percepção da qualidade de vida

6.5.7 COLETA SALIVAR

Serão coletadas amostras de saliva (ELISA Development Kit, 900-M21, Peprotech Inc, USA), nos períodos pré e pós corrida.

6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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.

6.7 RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos da participação na pesquisa são considerados de leves a moderados. Os leves devido a constrangimento para responder aos questionamentos ou cansaço devido à extensão dos instrumentos. Os riscos médios referem-se à coleta de sangue, que pode causar dor, desconforto, formação de hematomas e/ou outras lesões no local da coleta e, em alguns casos, pode haver ocorrência de desmaio. Em ambos os casos, os participantes serão atendidos e tratado por um profissional capacitado para a resolução do problema no próprio local, para estabelecer o seu bem estar físico. E em caso de qualquer efeito adverso, comprovadamente decorrente da presente pesquisa, será indenizado.

Com a participação na pesquisa terá como benefícios os resultados das avaliações realizadas além da orientação a respeito de todas as avaliações: alimentar, composição corporal, perfil inflamatório. O conhecimento destes determinantes pode auxiliar no planejamento dos treinos e melhora da performance.

6.8 CONDUTA ÉTICA

O projeto de pesquisa atende a Resolução 466/12, e estará sobre apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). A participação no estudo será voluntária, podendo o indivíduo solicitar, a qualquer momento, sua retirada/saída do estudo. Nenhum indivíduo terá custos para participar, bem como não irá receber remuneração para tal. A identidade dos indivíduos não será divulgada, de forma alguma, havendo sigilo nas informações fornecidas conforme as normas de ética em pesquisa

O Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado na UFCSPA coordenado pela professora orientadora do projeto bem como laboratórios de uso compartilhado na UFCSPA estão equipados com a estrutura necessária para realização dos experimentos propostos. Parte dos reagentes já foram adquiridos com verbas como PROAP e editais internos da Universidade. Os proponentes também irão participar de editais de fomento durante o período da realização do projeto.

6.9 DESCARTE DE RESÍDUOS

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

6.10 CRONOGRAMA

Quadro 1 – Cronograma das atividades a serem realizadas no período de setembro de 2021 a setembro de 2025.

Atividades	2021/ 2	2022/ 1	2022/ 2	2023/ 1	2023/ 2	2024/ 1	2024/ 2	2025/ 1
Revisão de literatura	X	X	X					
Elaboração do projeto	X	X						

Encaminhamento para CEPE e comitê de ética			X					
Coleta dos dados			X	X	X	X		
Relatório parcial do projeto de pesquisa				X				
Análise e interpretação dos dados						X	X	
Relatório parcial do projeto de pesquisa						X		
Redação do relatório final de pesquisa							X	X
Entrega e apresentação do artigo								X

7 ORÇAMENTO

O orçamento da presente pesquisa será de responsabilidade dos pesquisadores e dos recursos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA. Sendo que parte do material para a realização da pesquisa, encontra-se armazenado no laboratório, sob responsabilidade da professora Alessandra Peres.

Na Tabela 1 estão discriminados os materiais necessários para o desenvolvimento do projeto já existentes no laboratório. Na tabela 2 a discriminação dos materiais a serem adquiridos.

Tabela 1 - Discriminação dos materiais a serem utilizados do projeto já existentes.

Item	Quantidade
Leitor Espectrofotômetro	1
Citômetro de Fluxo	1
IgA, cortisol, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10	1 kit para 100 análises de cada
Capela fluxo laminar	3
Estufa CO ₂	1
Microscópio invertido	1
Linhagens celulares MCF-7, PC-3 e PNT1A	1 vial de cada linhagem
Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	1
Marcadores imunofenotipagem CD3+, CD4+, CD56, CD25, CD127, HLA-DR, CD27, CD28, CD57, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG3, KLRG1	1ml para 100 testes de cada marcador

Tabela 2 - Discriminação dos materiais a serem utilizados do projeto a serem adquiridos.

Item	Quantidade	Preço Unitário (R\$)	Custo (R\$)
Anti-Human CD8a APC	1 kit para 100 testes	1.060,00	1.060,00
Anti-Human CD14 PE	1 kit para 100 testes	1.823,00	1.823,00
Anti-Human CD16 FITC	1 kit para 100 testes	2.374,00	2.374,00
Anti-Human CD279 (PD-1) PE	1 kit para 100 testes	2.628,00	2.628,00
Anti-Human CD163 PE-Cyanine7	1 kit para 100 testes	3.137,00	3.137,00
Anti-Human CD45RA APC	1 kit para 100 testes	1.472,02	1.472,02
Anti-Human CD3 APC	1 kit para 100 testes	1.409,61	1.409,61
Transporte deslocamento dos participantes	200 passagens municipais	960,00	960,00
Total			14.863,63

8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Este projeto apresenta grande potencial na geração de estudos científicos que possam contribuir de forma significativa para a compreensão do potencial imunorregulador em atletas por infecção por Sars-Cov-2 que possa influenciar no acompanhamento de alterações inflamatórias induzidas pelo exercício. Além disso o uso do plasma dos atletas na suplementação das culturas tumorais permitirá melhor compreensão dos efeitos do exercício físico de atletas infectados pelo vírus no crescimento de células tumorais.

Desta forma pretende-se contribuir para o entendimento da resposta do sistema imune dos atletas para a prevenção, manutenção e recuperação durante o treinamento, proporcionando um benefício pleno na realização do exercício. Auxiliando na aplicação de estratégias não farmacológicas para a manutenção da qualidade de vida destes indivíduos.

9 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

1. Laddu DR, Lavie CJ, Phillips SA, Arena, R. Physical activity for immunity protection: Inoculating populations with healthy living medicine in preparation for the next pandemic. *Progr Cardiovasc Dis.* 2021;64(102).
2. Simpson RJ, Campbell JP, Gleeson M, Krüger K, Nieman DC, Pyne DB, et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection?. *Exerc Immunol Rev.* 2020;26:8-22.
3. Scheffer DDL, Latini A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10)
4. Dorneles GP, Dos passos AAZ, Romão PRT, Peres A. New Insights about Regulatory T Cells Distribution and Function with Exercise: The Role of Immunometabolism. *Curr Pharm Des.* 2020;26(9):979-90.
5. Zbinden-Foncea H, Francaux M, Deldicque L, Hawley JA. Does high cardiorespiratory fitness confer some protection against pro-inflammatory responses after infection by SARS-CoV-2?. *Obesity.* 2020;28:1378–81.
6. Idorn M, Thor SP. Exercise and cancer: from "healthy" to "therapeutic"? *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(5):667-671.
7. Stout NL, Baima J, Swisher AK, Winters-Stone KM, Welsh J. A Systematic Review of Exercise Systematic Reviews in the Cancer Literature (2005-2017). *PM&R.* 2017: S347-S384.
8. Gustafson MP, Wheatley-Guy CM, Rosenthal AC, Gastineau DA, Katsanis E. et al. Exercise and the immune system: taking steps to improve responses to cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2021;9(7).
9. Chamorro VC, Del-Valle MF, Tacón AM. Excessive exercise and immunity: The J-shaped curve. *The Active Female.* 2014:357-72.
10. Gonçalves CAM, Dantas PMS, Dos Santos IK, Dantas M, da Silva DCP, Cabral BGD. et al. Effect of acute and chronic aerobic exercise on immunological markers: a systematic review. *Front Physiol.* 2020;(10): 1602.
11. Nieman DC. Upper respiratory tract infections and exercise. *Thorax.* 1995;50(12): 1229-31.
12. Gleeson M, Pyne DB. Respiratory inflammation and infections in high-performance athletes. *Cell Immunol.* 2016;94(2):124-31.
13. Cauwenberghs N, Prunicki M., Sabovčik F, Perelman D, Contrepois K, Li X. et al. Temporal changes in soluble angiotensin-converting enzyme 2 associated with

metabolic health, body composition, and proteome dynamics during a weight loss diet intervention: a randomized trial with implications for the COVID-19 pandemic. *Am J Clin Nutr.* 2021;114(5):1655-65.

14. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, Mittoo S, Weissert R, Kass JS. et al. Cytokine storm in COVID-19—immunopathological mechanisms, clinical considerations, and therapeutic approaches: the REPROGRAM consortium position paper. *Front Immunol.* 2021;11:1648.

15. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93(1):250-6.

16. Jakobsson J, Cotgreave I, Furberg M, Arnberg N, Svensson, M. Potential physiological and cellular mechanisms of exercise that decrease the risk of severe complications and mortality following sars-cov-2 infection. *Sports.* 2021;9(9):121.

17. Wilson MG, Hull JH, Rogers J, Pollock N, Dodd M, Haines J. et al. Cardiorespiratory considerations for return-to-play in elite athletes after COVID-19 infection: a practical guide for sport and exercise medicine physicians. *BMJ.* 2020;54(19): 1157-61.

18. Fernández-Lázaro D, González-Bernal JJ, Sánchez-Serrano N, Navascués LJ, Ascaso-del-Río A, Mielgo-Ayuso J. Physical Exercise as a Multimodal Tool for COVID-19: Could It Be Used as a Preventive Strategy?. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(22): 8496.

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

20. Hino AAF, Reis RS, RODRIGUEZ-AÑEZ R, FERMINO RC. Prevalência de lesões em corredores de rua e fatores associados. *Rev bras ciênc esporte.* 2009;15(1):36-9.

21. Mohamed AA, Alawna M. Role of increasing the aerobic capacity on improving the function of immune and respiratory systems in patients with coronavirus (COVID-19): A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(4):489-496.

22. Mohamed AA, Alawna M. The effect of aerobic exercise on immune biomarkers and symptoms severity and progression in patients with COVID-19: A randomized control trial. *J Bodyw Mov Ther.* 2021;28:425-32.

23. Notz Q, Schmalzing M, Wedekink F., Schlesinger T, Gernert M, Herrmann J. et al. Pro-and anti-inflammatory responses in severe COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome—an observational pilot study. *Front Immunol.* 2020;11.

24. McDowell SL, Hughes RA, Hughes RJ, Housh TJ, Johnson GO. The Effect of Exercise Training on Salivary Immunoglobulin A and Cortisol Responses to Maximal Exercise. *Sports Med Int.* 1992;13(08): 577-80.

25. Jackson AS, Pollock M. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr.* 1978;497-504.
26. Jackson AS, Pollock ML, Ward ANN. Generalized equations for predicting body density of women. *Med Sci Sports Exerc.* 1980;12(3):175-81.
27. Siri WE. "Body composition from fluids spaces and density: Analysis of two methods." *Techniques for Measuring Body Composition.* 1961:223-4.
28. Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus, 2002.
29. Crispim SP, Ribeiro RDCL, Panato E, Silva MMSD, Rosado LEFP, Rosado GP. Validade relativa de um questionário de frequência alimentar para utilização em adultos. *Rev Nut.* 2009;22:81-95.
30. Shivappa N, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR, Hébert JR. Projetar e desenvolver um índice inflamatório alimentar baseado na população, derivado da literatura. *Nutrição em saúde pública.* 2014;17 (8):1689-96.
31. Bicalho HM, Gontijo CM, Nogueira-Machado JA. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *J Immunol Methods.* 1981;40(1):115-16.
32. Borg GAV. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc.* 1982;14:377-81
33. Ciconelli RM. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev Bras Reumatol.* 1999;39:143-150.

ANEXO A - QUESTIONÁRIO DE RASTREAMENTO METABÓLICO

Nome: _____

Sexo: () Masculino () Feminino Data: _____

Avalie cada sintoma seu baseado em seu perfil de saúde típica no seguinte período:

*últimos 30 dias

*última semana

*últimas 48 horas

Escala de Pontos

- 0** – Nunca ou quase nunca teve o sintoma
1 – Ocasionalmente teve, efeito não foi severo
2 – Ocasionalmente teve, efeito foi severo
3 – Frequentemente teve, efeito não foi severo
4 – Frequentemente teve, efeito foi severo

		TOTAL
CABEÇA	• Dor de cabeça • Sensação de desmaio • Tonturas • Insônia	
OLHOS	• Lacrimejantes ou coçando • Inchados, vermelhos, ou com os cílios colando • Bolsas ou olheiras abaixo dos olhos • Visão borrada ou em túnel (não inclui miopia ou astigmatismo)	
OUVIDOS	• Coceiras • Dores de ouvido, infecções auditivas • Retirada de fluido purulento do ouvido • Zunido e perda da audição	
NARIZ	• Entupido • Problemas de Seios Nasais (Sinusite) • Corrimento nasal, espirros, lacrimejamento e coceira dos olhos (todos juntos)	
BOCA/GARGANTA	• Tosse crônica • Frequente necessidade de limpar a garganta • Dor de garganta, rouquidão ou perda da voz • Língua, gengivas ou lábios inchados / descoloridos • Aftas	
PELE	• Acne • Feridas que coçam, erupções ou pele seca • Perda de cabelo • Vermelhidão, calorões • Suor excessivo	
CORAÇÃO	• Batidas irregulares ou falhando • Batidas rápidas demais • Dor no peito	

Avalie cada sintoma seu baseado em seu perfil de saúde típica no seguinte período:

*últimos 30 dias

*última semana

*últimas 48 horas

Escala de Pontos

- 0** – Nunca ou quase nunca teve o sintoma
1 – Ocasionalmente teve, efeito não foi severo
2 – Ocasionalmente teve, efeito foi severo
3 – Frequentemente teve, efeito não foi severo
4 – Frequentemente teve, efeito foi severo

		TOTAL
PULMÕES	• Congestão no peito • Asma, bronquite • Pouco fôlego • Dificuldade para respirar	
TRATO DIGESTIVO	• Náuseas, vômito • Diarreia • Constipação / prisão de ventre • Sente-se inchado / com abdômen distendido • Arrotos e/ou gases intestinais • Azia • Dor estomacal / intestinal	
ARTICULAÇÕES/ MÚSCULOS	• Dores articulares • Artrite / artrose • Rigidez ou limitação dos movimentos • Dores musculares • Sensação de fraqueza ou cansaço	
ENERGIA/ ATIVIDADE	• Fadiga, moleza • Apatia, letargia • Hiperatividade • Dificuldade em descansar, relaxar	
MENTE	• Memória ruim • Confusão mental, compreensão ruim • Concentração ruim • Fraca coordenação motora • Dificuldade em tomar decisões • Fala com repetições de sons ou palavras, com várias pausas involuntárias • Pronuncia palavras indistinta, confusa • Problemas de aprendizagem	
EMOÇÕES	• Mudanças de humor, Mau humor matinal • Ansiedade, medo e nervosismo • Raiva, irritabilidade, agressividade • Depressão	
OUTROS	• Frequentemente doente • Frequente ou urgente vontade de urinar • Coceira genital ou corrimento • Edema / Inchaço – Pés / Pernas / Mãos	
	Total de Pontos	

“Com a permissão de The Institute for Functional Medicine - www.Functionalmedicine.org”

Todos os direitos reservados ao Centro Brasileiro de Nutrição Funcional.

[illegible][illegible]

CEREAIS/LEGUMINOSAS

[illegible]

HORTALIÇAS E FRUTAS

[illegible]

SOBREMESAS E DOCES

[illegible]

ANEXO C - QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA (SHORT-FORM HEALTH SURVEY (SF-36))

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes	Definitivamente falso

				falso	
a) Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do estudo: Estudo do perfil alimentar e imunológico de atletas soropositivos para SARS-CoV-2

Pesquisadora: Priscila da Trindade Flores

Pesquisadora responsável: Prof.^a Dra. Alessandra Peres

Instituição: UFCSPA

Local da análise de dados: Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Telefone para contato: (55) 991344971

E-mail para contato: prisciladatrindeflores@gmail.com

Você está sendo convidado(a) a participar da coleta de dados desta pesquisa de forma totalmente voluntária e sem custos. Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de decidir participar. A participação neste estudo é voluntária e livre, podendo ser cancelada em qualquer fase do processo. Não haverá compensação financeira para os participantes relacionada à sua participação. Ao participar do estudo você receberá uma via deste termo.

Com a participação neste estudo você contribuirá para a compreensão dos efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica de atletas, bem como compreender se há correlação entre volume de treinamento físico e propensão a infecções de mucosas e sistema respiratório bem como na qualidade de vida. Considerando a pandemia da COVID-19, pretendemos verificar um possível impacto da COVID-19 no sistema imunológico dos atletas.

A coleta de dados para este estudo constará em responder uma ficha de anamnese com informações gerais e de saúde e questionário de rastreamento metabólico e qualidade de vida. Para avaliar a ingestão alimentar, você preencherá um registro alimentar de três dias e questionário de frequência alimentar (QFA). As orientações quanto ao preenchimento serão realizadas por acadêmico(a) treinado(a), com o objetivo de obter informações que permitam definir e quantificar a alimentação consumida, no período de referência, sem indução de respostas. Será necessário realizar o registro diário do treino.

Para avaliar seu perfil inflamatório, serão colhidas amostras de sangue, na sala de coleta do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, localizado no segundo andar do prédio II da universidade, por um profissional habilitado. Para colheita de sangue serão necessários em torno de 10 minutos. Nenhuma amostra de sangue será armazenada. O descarte será realizado em sacos brancos e a agulha será descartada imediatamente após o procedimento em recipientes apropriados para materiais perfuro cortantes. Todo o procedimento será realizado obedecendo às normas de biossegurança para material biológico. Também será medido seu peso, altura e dobras cutâneas nos dias das avaliações.

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.

Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, e você poderá desistir após ter concordado em participar do estudo em qualquer momento, sem que haja nenhuma responsabilidade ou qualquer prejuízo. Informamos que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Com a participação na pesquisa terá como benefício os resultados das avaliações realizadas além da orientação a respeito de todas as avaliações; alimentar, composição corporal, perfil inflamatório.

Os riscos da participação na pesquisa são considerados de leves a moderados. Os leves devido a constrangimento para responder aos questionamentos ou cansaço devido à extensão dos instrumentos. Os riscos médios referem-se à coleta de sangue, que pode causar dor, desconforto, formação de hematomas e/ou outras lesões no local da coleta e, em alguns casos, pode haver ocorrência de desmaio. Caso ocorra, você será atendido e tratado por um profissional capacitado para a resolução do problema no próprio local, para estabelecer o seu bem-estar físico. E em caso de qualquer efeito adverso, comprovadamente decorrente da presente pesquisa, você será indenizado

Os dados levantados serão confidenciais, resguardando a identidade dos sujeitos, e poderão ser utilizados para estudos e publicações científicas, por 5 anos,

mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade. Ficando sob responsabilidade dos pesquisadores para futuros estudos, desde que seja respeitada totalmente sua privacidade e confidencialidade. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados obtidos e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Assim, ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto,

Eu _____, portador (a) da carteira de identidade número _____, afirmo que, após a leitura deste documento e de esclarecimentos dados pelos pesquisadores, concordo com a realização desta pesquisa e autorizo minha participação, como também autorizo a publicação em meio acadêmico dos dados, informações e outros procedimentos coletados nesta pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento conforme minha necessidade. Considero-me igualmente informado: sobre os procedimentos nos quais estarei envolvido, dos riscos e benefícios esperados.
Assinatura: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 2021.

Caso você tenha dúvidas ou solicite esclarecimentos, entrar em contato com o pesquisador responsável professora Alessandra Peres email: peres@ufcspa.edu.br e telefone: (51)99619331, ou com a autora Priscila da Trindade Flores email: prisciladatrindadeflores@gmail.com e telefone (55)991344971, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA pelo telefone (51)3303-8804.

Observação: O presente documento baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (resolução 466/12), será assinado em suas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do paciente ou de seu representante legal e outra com o pesquisador responsável.

APÊNDICE B - ENTREVISTA ESTRUTURADA E FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome:	Data de Nascimento:
Raça:	Profissão:
Escolaridade:	Estado civil:
Tabagista: () Sim () Não.	Horas média de sono:
Medicamentos de uso contínuo (dose/frequência)	
Uso de anti-inflamatório nos últimos 15 dias? () Sim () Não.	
Uso de álcool: () Sim () Não. Consumo: () diário; () semanal; () eventual. Se sim, qual a quantidade em copos:	
Doenças associadas?	Cirurgia nos últimos 6 meses?
Hábito intestinal: () normal () constipado(a) .	
Frequência de evacuações: () diária () a cada 2 dias () a cada 3 dias () _____	
Consumo de água você toma ao dia: _____ copos	

Atividade física	
Modalidades esportivas:	Frequência semanal:
Há quanto tempo pratica?	Duração média do treino em horas:
Faz acompanhamento com assessoria esportiva? () Sim () Não.	

Teve COVID-19 ? () Sim () Não.	Apresentou sintomas () Sim () Não.
Quais?	
Precisou de internação? () Sim () Não.	
Foi vacinado para COVID-19? () Sim () Não	Detalhar esquema vacinal (tipos/datas):

Faz acompanhamento nutricional com nutricionista? () Sim () Não.	
Usa suplementos nutricionais?	Quem orientou? () Nutricionista () Outros
Nome comercial:	Quantidade?
Frequência diária:	Frequência semanal:
Uso de esteroides anabolizantes?	Quantidade?
Tempo de uso? Frequência?	

Avaliação antropométrica			
Peso (kg)			
Altura (cm)			
Tríceps (mm)			
Torácica(mm)			
Abdome (mm)			
Axilar média (mm)			
Subescapular (mm)			
Suprailíaca (mm)			
Coxa medial (mm)			

Densidade corporal: _____

Massa Magra _____ kg _____ %

Massa Gorda _____ kg _____ %

APÊNDICE C - REGISTRO ALIMENTAR – INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO

- O diário alimentar deve ser preenchido pelo próprio atleta em três dias, sendo um no final de semana.
- Faça descrições de alimentos e bebidas como, por exemplo, tipo de pão (trigo, integral, etc.) ou tipo de leite (integral, desnatado, semidesnatado).
- Para anotar as quantidades, usar medidas como “colher de sopa” (rasa, média ou cheia), “colher de sobremesa”, “colher de chá”, “colher de café” . Exemplo: arroz cozido– 3 colheres de sopa rasas.
- Anotar o modo de preparo dos alimentos (frito, cozido, assada, à milanesa).
- No caso de ingerir alimentos cujo preparo seja mais sofisticado, referir no “modo de preparo” os ingredientes utilizados (receita). Exemplo: Lasanha: (frango, massa de lasanha, molho branco, cebola, tomate, queijo).
- Sempre referir o nome comercial dos produtos e a quantidade ingerida. Exemplo: Uma lata de refrigerante “guaraná light” 350 ml.
- Para anotar as quantidades, usar medidas como “colher de sopa” (rasa, média ou cheia), “colher de sobremesa”, “colher de chá”, “colher de café”. Exemplo: arroz cozido – 3 colheres de sopa rasas.
- Para as saladas, favor especificar as verduras e legumes que compõem a mesma, e dizer se estão crus ou cozidos. Referir o tempero utilizado, bem como a quantidade.
- Anotar se nas bebidas como café, chá e sucos foi usado açúcar ou adoçante, bem como a quantidade dos mesmos.

- Bebidas comerciais isotônicas devem ser referidas, bem como uso de outros complementos nutricionais com os devidos horários e quantidades.

- Bebidas alcóolicas devem ser incluídas, bem como suas quantidades.

* No caso de haver dúvidas quanto ao preenchimento, por favor anotar no diário para consulta posterior ao pesquisador.

Atenção:

Lembramos que as informações alimentares deverão ser as mais precisas possíveis, pois estas serão utilizadas para cálculos posteriores, de acordo com as informações fornecidas nestes três registros.

NOTA: Se tiver balança ou conhecer o peso do alimento pode referi-lo

Obrigada,

Priscila Flores

91344971

REGISTRO ALIMENTAR

Data _____ Dia da semana: _____ () com treino () sem treino

Nome _____

Horário	Alimentos sólidos e líquidos	Forma de preparo	Quantidade em medidas caseiras

APÊNDICE D – REGISTRO DE ATIVIDADES FÍSICAS DIÁRIAS

DIA DO MÊS	TIPO DE EXERCÍCIO	VOLUME	INTENSIDADE (FC máx)	PSE
		Corrida: KM percorridos Outras atividades: tempo		
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				
15.				
16.				
17.				
18.				
19.				
20.				
21.				
22.				
23.				
24.				
25.				
26.				
27.				
28.				
29.				
30.				
31.				

6	Sem nenhum esforço
7	
	Extremamente leve
8	
9	Muito leve
10	
11	Leve
12	
13	Um pouco intenso
14	
15	Intenso (pesado)
16	
17	Muito intenso
18	
19	Extremamente intenso
20	Máximo esforço

Figura 1. Escala RPE (*rating of perceived exertion*) de Borg



PROJETO DE PESQUISA

**Título: Transformando resíduos de alimentos em moda sustentável:
Tingimento natural em tecidos com baixo impacto no meio ambiente e na saúde,
inspirando o consumo consciente através do *slow fashion***

PROPONENTE: Profa Dra. Ana Cristina Borba da Cunha -UFCSPA- DFC

Colaboradoras

Profa Dra.Marla Biajoli - UFCSPA- DFC

Profa Dra.Simone Schneider Amaral -UFCSPA- DFC

Profa Cristine Souza Goebel- UFCSPA- Departamento de Métodos e diagnósticos

Porto Alegre, Junho de 2023

Resumo

O tingimento natural de tecidos é definido como o processo químico da modificação de cor da fibra têxtil através da aplicação de matérias coradas. Esse processo é uma prática milenar de forma manufaturada, sendo o primeiro meio utilizado para colorir tecidos e que foi muito utilizado no século XIX. A aplicação de corantes químicos (sintéticos) pela indústria têxtil levou as práticas dos corantes naturais a caírem em desuso. Sabe-se que, juntamente com os corantes sintéticos, surgiram preocupações ambientais devido ao grande consumo de água e a carga poluidora gerada a partir de seus efluentes. Contudo, uma nova onda de tingimentos naturais, impulsionada pelo desejo de métodos mais sustentáveis para o meio ambiente (slow fashion), vem tomando força nas últimas décadas, com o abandono dos tecidos e corantes sintéticos e o retorno ao algodão e às plantas. O presente trabalho reaproveita resíduos de cebola amarela e roxa (*Allium cepa* L.) e feijão preto com data de validade expirada (*Phaseolus vulgaris* L.), ricos em flavonoides. Como mordentes naturais, serão utilizados cloreto de sódio e tanino. As técnicas de extração-fixação dos corantes serão realizadas com os resíduos e mordentes citados, água, aquecimento em chapas com temperaturas controladas e lavagem dos tingimentos em água corrente. Os testes de solidez da cor, que se referem à capacidade dos artigos tingidos de não perderem a coloração com o tempo de uso, serão realizados com base na norma ABNT NBR ISO 105-C06:2010 [1]. Para avaliação da solidez será utilizada a escala de cinza que é internacionalmente utilizada e permite quantificar numericamente o grau de desbotamento do corante testado. Ao término do projeto, pretende-se dominar as técnicas já existentes de tingimento natural, desenvolver duas novas técnicas de tingimento sustentáveis, depositar patente das técnicas desenvolvidas e formar mão de obra com expertise em tingimento natural, fortalecendo os cursos de química medicinal, biomedicina, farmácia, tecnologia em alimentos e toxicologia analítica da UFCSPA.

Palavras-chave: Tingimento natural, resíduos de alimentos, sustentabilidade, solidez da cor

1. Caracterização da proposta

Conforme os dados da ABIT - Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção, atualizados em fevereiro de 2023, o faturamento da cadeia têxtil e de confecção atingiu 161 bilhões de reais em 2020, com 1,06 bilhão de dólares em exportações [2]. A indústria têxtil é também um dos maiores setores responsáveis pela emissão de poluentes para o meio ambiente, contribuindo para a poluição atmosférica, do solo e dos corpos hídricos, além de possuir uma elevada demanda por água e energia elétrica. Dessa forma, a indústria têxtil causa impactos ambientais extremamente negativos ao planeta e requer muita atenção [3]. Esse ramo trabalha com a lógica de alimentar o mercado com novos modelos e tendências de forma sazonal (por estação), influenciando as pessoas a sentirem a necessidade de renovar seus guarda-roupas constantemente, mantendo o mercado da moda "aquecido" e gerando lucros exorbitantes de forma ininterrupta. Esse modelo de negócios influenciou o aparecimento de um movimento conhecido como "fast fashion" ou moda rápida, com o objetivo de replicar e disponibilizar aos consumidores os modelos da alta costura de forma rápida, de baixo custo e utilizando mão de obra barata com trabalhos análogos à escravidão. Assim, esses produtos são produzidos, comercializados, consumidos e descartados constantemente. Por estarem frequentemente associadas à matéria-prima de baixo custo, de origem sintética e não renovável, as indústrias têxteis têm sido apontadas como responsáveis por uma quantidade importante de resíduos, especialmente líquidos e sólidos, e por diversos crimes ambientais. O poliéster, um plástico, é a fibra química mais utilizada no processo e leva cerca de 200 anos para se degradar. Esses fios são a principal matéria-prima dos tecidos de vestuário de moda "fast fashion" [4, 5]. De maneira geral, os materiais descartados pelas "fast fashion" apresentam persistência, baixa degradação e, quando descartados de forma inadequada, se decompõem em microplásticos (0,1-1000 µm). Cerca de 35% dessas partículas vêm de roupas com tecidos sintéticos que se soltam na água durante o processo de lavagem das roupas [4, 5]. Os microplásticos, gerados pela degradação do resíduo plástico liberado de forma inadequada ao meio ambiente, são uma ameaça tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana. Uma das formas que o ser humano pode entrar em contato com os microplásticos é através da ingestão dos mesmos. Cox (2019) [6] estima que, anualmente, uma pessoa ingere entre 39.000 e 52.000 partículas de microplásticos. Dada a prevalência dos microplásticos no ambiente marinho, é possível que os frutos do mar sejam uma das rotas de exposição [7]. Isso inclui peixes, moluscos e crustáceos.

No entanto, os microplásticos também foram encontrados em outros produtos alimentícios, como sal de cozinha, mel, açúcar e água engarrafada [6-8]. A inalação de micropartículas de plástico dispersas no ar por diferentes fontes, como tecidos sintéticos, abrasão de materiais e ressuspensão de microplásticos encontrados em superfícies constitui outra forma de entrada de microplásticos em nosso organismo. Os microplásticos, ao se infiltrarem no corpo humano pela via respiratória ou gastrointestinal, são capazes de desencadear respostas e efeitos prejudiciais ao ser humano. As partículas de microplásticos podem translocar de uma parte do corpo a outra, afetando outros órgãos e tecidos, e, desta maneira, são capazes de causar efeitos neurotóxicos ao entrarem em contato com o sistema nervoso ou afetar o sistema imune, já que o contato com material particulado está ligado à exposição de autoantígenos e à produção de autoanticorpos [8]. Devido à sua alta área de superfície, os microplásticos ainda podem atuar como vetores de microorganismos, podendo desencadear infecções ou alterações persistentes na microbiota gastrointestinal [8].

Diante de todos os efeitos prejudiciais ao meio ambiente e a nossa saúde relacionados à *fast fashion*, e em contraposição a esse cenário, um número crescente de consumidores têm buscado por produtos mais sustentáveis na área do vestuário e por empresas que adotem os critérios ESG (do inglês: ambiente, social e governança) [9]. A partir desses novos conceitos, surgiu o movimento “slow fashion”, ou moda lenta, que é uma alternativa para romper com as formas produtivas tradicionais. Esse movimento defende o consumo consciente, com princípios de qualidade, preservação, durabilidade das peças, práticas de economia circular e tingimento natural [10], assim como objetiva melhorar a qualidade dos produtos e gerar menor impacto ambiental e social [11]. Diante do exposto sobre os efeitos da fast fashion e as novas tendências do mercado focadas na busca por técnicas ambientalmente amigáveis, este trabalho tem como prioridade o desenvolvimento e a padronização de técnicas de tingimento natural. Nesse processo, serão selecionadas prioritariamente cascas de cebola amarela, cascas de cebola roxa e feijão preto com data de validade expirada, que, caso não sejam reutilizados, seriam descartados em aterros sanitários ou lixões, contribuindo para a sua saturação. Esse descarte não só polui o meio ambiente, mas também aumenta os gastos públicos com transporte e armazenamento. Além disso, serão utilizados mordentes naturais, como o cloreto de sódio e o tanino, em busca do equilíbrio entre produção têxtil e sustentabilidade.

2. Objetivos gerais e específicos

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver técnicas de tingimento natural em tecidos a partir de resíduos alimentares, tais como cascas de cebola amarela, cascas de cebola roxa e feijão preto com prazo de validade expirado, com o objetivo de minimizar os impactos ambientais causados pela indústria têxtil.

2.2. Objetivos específicos

- Buscar estabelecimentos comerciais para a doação de resíduos de cascas de cebolas amarela e roxa e feijão preto com data de validade expirada (próximos a UFCSPA) e estabelecer uma rotina de coleta desses resíduos para serem utilizados como corantes naturais.
- Desenvolver metodologias de tingimento sustentável em tecido utilizando preferencialmente cascas de cebola amarela e roxa e feijão preto, com objetivo de obter a maior quantidade de cores possíveis.
- Revisar a literatura em busca de metodologias para padronizar as metodologias desenvolvidas (ainda não encontradas na literatura) e ,quando possível patenteá-las.
- Buscar parcerias com ONGs, ateliês de costura, institutos e empresas no ramo têxtil para aplicar os processos de tingimento desenvolvidos em escalas maiores, com o objetivo de produzir peças do ramo têxtil e upcycling de peças usadas, completamente sustentáveis, visando promover a divulgação dos produtos gerados, possibilitando maior conscientização e sensibilização do público em relação à importância da sustentabilidade na indústria têxtil.

3. Metodologia proposta

O presente projeto será realizado no laboratório de farmacociências, prédio 3, sala 405.

3.1. Obtenção e seleção da matéria prima para o corante natural (cascas de cebola).

Serão procuradas parcerias em armazéns, feiras de rua, supermercados, quitandas, fruteiras, restaurantes e semelhantes para (preferencialmente próximo da UFCSPA) para doação dos resíduos em estudo (cascas de cebola amarela, roxa e feijão preto com data de validade expirada) Os estabelecimentos “parceiros” serão cadastrados e será realizado um cronograma de coletas periódicas nesses estabelecimentos. As cascas de cebola e o feijão preto serão devidamente embaladas e armazenadas no Laboratório de Farmacociências (prédio 3, sala 405) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e será realizado um cronograma de coletas mensais nesses estabelecimentos.

3.2. Desenvolvimento experimental

3.2.1. Preparação do tecido

Antes de iniciar o processo de tingimento, as peças inteiras de algodão e seda crua serão lavadas mecanicamente com sabão neutro (serão colocados em uma bacia contendo 5 litros de água da torneira e 500 mL de sabão neutro de glicerina, e deixados em repouso por 24 horas), a fim de limpar os tecidos e abrir as fibras. Após a lavagem, as peças serão secas à sombra. Em seguida, os tecidos de algodão e seda serão cortados de forma padronizada em quadrados com cerca de 12x12 cm, resultando em aproximadamente 2,000 gramas de tecido. Após a lavagem, os tecidos serão identificados com o nome do corante e do fixador que serão utilizados. A lavagem tem como objetivo a remoção de resíduos e ceras do tecido e a abertura de suas fibras, facilitando a adesão do pigmento.

3.2.2. Metodologia de extração/fixação dos corantes

As técnicas de tingimento empregadas serão desenvolvidas a partir de adaptações das patentes referentes a metodologias de tingimento pesquisadas em plataformas on-line gratuitas de busca de patentes, como *SpaceNet*, *Patentscope* e *Google Patents*, sendo efetuadas modificações para aumentar o espectro de cores e adequar as metodologias aos princípios de sustentabilidade almejados neste trabalho. Para a execução do

projeto, serão estabelecidas três metodologias para tingimentos naturais, cada uma utilizando um tipo de resíduo diferente - casca de cebola roxa, casca de cebola amarela e feijão preto vencido. Os mordentes naturais (cloreto de sódio ou tanino) serão adicionados durante o processo de extração em uma técnica denominada na literatura como mordente conjugado, que não necessita de um pré-tratamento com o mordente, sendo adicionado durante o processo de extração. As etapas de extração e fixação serão desenvolvidas em meio neutro, básico e ácido.

OBS: Para todos os procedimentos de tingimento os valores de massa e volume estão registrados como “aproximadamente” porque serão aferidos no desenvolvimento da metodologia e então medidos com exatidão e precisão (massas em balança analítica e volumes em buretas ou micropipetas), considerando o objetivo específico relacionado a depósitos de patentes.

3.2.2.1. Processo de extração/fixação em meio neutro (água destilada fervida a 105°C por 1h e 10 minutos e deixar esfriar à temperatura ambiente , tapada com papel alumínio)

3.2.2.1.1. Metodologia de tingimento dos tecidos utilizando casca de cebola amarela

Metodologia: mordente conjugado

As cascas de cebola serão lavadas com água corrente para retirar as impurezas da pele das cascas e, em seguida, secas à sombra. Após esse processo de lavagem, pesar aproximadamente 6,0 gramas de casca de cebola amarela em um béquer e adicionar cerca de 100 mL de água destilada (medidos em uma bureta) e 8 gramas de mordente (cloreto de sódio ou tanino, dependendo da metodologia escolhida). Misturar a solução com um bastão de vidro e submergir o tecido para evitar que ocorram manchas. Colocar o béquer em uma chapa de aquecimento com controle de temperatura previamente aquecida e levar solução à fervura em torno de 20-30 minutos solução até atingir 80°C, mantendo essa temperatura por 5 minutos cronometrados. Após esse tempo, retirar o béquer da chapa de aquecimento e manter o tecido em repouso na solução por mais 1 hora. Após o repouso, retirar o tecido da solução, lavar com água corrente e sabão neutro por aproximadamente 1 minuto, enxaguar e colocar o tecido estendido na sombra para secar. As cascas de cebola devem ser retiradas da solução por processo de filtração antes do repouso do tecido.

3.2.2.1.2. Metodologia de tingimento dos tecidos utilizando casca de cebola roxa

Metodologia: mordente conjugado

As cascas de cebola serão lavadas com água destilada para retirar as impurezas da pele das cascas e deixadas secar à sombra. Após esse processo, pesar em um béquer aproximadamente 13 gramas de casca de cebola roxa. Medir com o auxílio de uma bureta aproximadamente 360 mL de água destilada e adicionar aproximadamente 20 gramas de mordente (cloreto de sódio ou tanino em processos de extração separados). Inserir a água destilada, as cascas de cebola, o mordente e o tecido em um copo de béquer de 1 L. Com o auxílio de um bastão de vidro, misturar a solução e submergir o tecido para evitar que ocorram manchas. Colocar o copo de béquer em uma chapa de aquecimento com controle de temperatura previamente aquecida e levar à fervura por 20-30 minutos até a solução atingir 80°C. Após atingir a temperatura, manter a temperatura por 5 minutos cronometrados e retirar o béquer da chapa de aquecimento. Retirar todas as cascas de cebola da solução por processo de filtração e manter o tecido em repouso na solução sem cascas de cebola por mais 1 hora. Após o repouso, retirar o tecido e lavar com água corrente e sabão líquido de glicerina por aproximadamente 1 minuto, enxaguar e colocar o tecido estendido na sombra.

3.2.2.1.3. Metodologia de tingimento dos tecidos utilizando feijão preto com validade expirada

Metodologia: mordente conjugado

Os grãos de feijão serão lavados com água corrente para retirar as impurezas da pele das cascas e deixados para secar à sombra. A data de validade dos grãos deve ser registrada. Após esse processo, pesar aproximadamente 260 gramas de feijão preto em um béquer. Medir com o auxílio de uma bureta cerca de 400 mL de água corrente e adicionar aproximadamente 60 gramas de mordente (cloreto de sódio/tanino). Inserir a água, os grãos de feijão, o mordente e o tecido em um copo de béquer de 2 L e, com o auxílio de um bastão de vidro, misturar a solução e submergir o tecido para evitar manchas. Colocar o copo de béquer em uma chapa de aquecimento com controle de temperatura previamente aquecida e levar a solução à ebulição por cerca de 20 a 30 minutos, deixando a mistura em ebulição por 5 minutos. Após retirar o béquer do aquecimento, deixar a mistura com os feijões em repouso por 72 horas. Em seguida, retirar o tecido e lavá-lo com água corrente e sabão líquido de glicerina por cerca de 1 minuto, enxaguar e colocar o tecido estendido na sombra.

3.2.2.2. Processo de extração/fixação em meio neutro/meio ácido: será utilizado o vinagre (não tóxico, com prazo de validade expirado) para a alteração do pH da água

Considerando o pH da água destilada 6,51, será adicionado para cada 250 mL de água destilada um volume entre 500 e 1000 mL de vinagre visando a obtenção do pH em torno de 3,00. Esses valores serão dimensionados para o volume de água selecionado para a metodologia. Após acidificar a solução, as metodologias aplicadas serão as mesmas dos itens: 3.2.2.1.1., 3.2.2.1.2. e 3.2.2.1.3, observando a mudança de pH da água de neutro para ácido.

3.2.2.3. Processo de extração/fixação em meio básico: será utilizado o bicarbonato de sódio (não tóxico, com prazo de validade expirado) para a alteração do pH da água.

Considerando o pH da água destilada 6,51, será adicionado para cada 250 mL de água destilada uma massa de aproximadamente 3 gramas de bicarbonato de sódio, esperando-se obter pH em torno de 8,00. Esses valores serão dimensionados para o volume de água selecionado para a metodologia. Após acidificar a solução, as metodologias aplicadas serão as mesmas dos itens: 3.2.2.1.1., 3.2.2.1.2. e 3.2.2.1.3, observando a mudança de pH da água de neutro para ácido.

3.3. Testes de avaliação da solidez da cor

O termo solidez da cor refere-se à capacidade dos artigos tingidos de manterem a coloração ao longo do tempo e do uso. Entre outros fatores, a perda de coloração pode ocorrer devido à dessorção do corante durante a lavagem com água, à degradação do corante por ação do calor, da radiação solar, de ácidos ou álcalis [12,13]. O grau de solidez da cor do tecido é avaliado de acordo com a descoloração de uma amostra e a mancha do tecido de forro não tingido.

3.3.1. Preparação da testemunha e do corpo de prova para avaliação da solidez da cor

Para a avaliação dos tecidos tingidos no projeto, serão preparados um tecido de controle e um corpo de prova, ambos com medidas de (100 ± 2) mm x (40 ± 2) mm. O tecido de controle será somente tingido na cor que será avaliada, sem passar pelo processo de

lavagem, enquanto o corpo de prova será submetido ao processo de lavagem para avaliar a solidez da cor.

O corpo de prova, após tingido, seguirá as orientações da norma ABNT NBR ISO 105-C06:2010 [1] para lavagem. Serão dissolvidos 4 g de detergente sem alvejante por litro de água destilada resfriada a 20°C. Para tecidos como a seda, algodão e linho, não será necessário ajuste de pH. O corpo de prova será lavado utilizando 150 mL da solução de lavagem a 40°C em um shaker horizontal com agitação a uma frequência de aproximadamente $40 \pm 2 \text{ min}^{-1}$ por 30 minutos. Após, o corpo de prova será enxaguado duas vezes, por 1 minuto cada vez, com duas porções distintas de 100 mL de água destilada a 40°C. Em seguida, cada corpo de prova será tratado com 100 mL de uma solução de ácido acético glacial (200 mg/L) por 1 minuto a 30°C e enxaguado com 100 mL de água a 30°C por 1 minuto. Depois do enxágue, o corpo de prova será pendurado para secagem à sombra, a uma temperatura que não exceda 60°C. Após secar, a cor do tecido testemunha e a do corpo de prova serão comparadas utilizando a escala cinza [1].

3.3.2. Avaliação da solidez da cor utilizando a escala cinza

O teste de solidez da cor será realizado de acordo com a norma ABNT NBR ISO 105-C06:2010 [1]. Para avaliar a solidez, será usada a escala cinza, que é internacionalmente aceita e permite quantificar numericamente o grau de desbotamento do corante testado. A escala cinza consiste em nove pares de campos cinza padrão, onde cada um representa uma diferença na cor ou contraste que ilustra as variações visualmente perceptíveis de cor ocorridas durante os ensaios correspondentes aos índices de solidez, de acordo com os requisitos das normas ABNT NBR ISO 105-A02, ISO 105-A02, DIN EN 20105-A02 e ASTM D2616 [14-17]. A classificação da escala de cinza para a mudança de cor é determinada usando níveis de cinco graus e sistemas de nove graus, com o grau 5 representando a melhor solidez da cor e o grau 1 representando a pior solidez da cor. Os níveis intermediários podem ser avaliados como meio grau: grau 4-5, grau 4 e grau 3-4 [18]. A diferença de cor entre os retângulos da escala cinza pode ser vista na tabela 1.

Tabela 1: Diferença de cor entre os retângulos da escala cinza

Grau de solidez	
5	Nenhuma alteração
4	Muito pouca alteração
3	Pouca alteração
2	Alteração moderada
1	Muita alteração

Fonte: (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS, 2006) [14].

As escalas são compostas por um conjunto de pares de blocos de cores controladas, onde a variação de cor obtida nos testes de solidez pode ser quantificada por comparação visual em uma Cabine de Cores, sob luz padronizada [19]. Além da luz padronizada, as amostras devem estar posicionadas a 45° do plano horizontal, e os olhos do avaliador devem estar a 90° em relação à amostra, a uma distância entre 50 e 70 cm da amostra. É recomendado que o avaliador use roupas cinza, evitando esmaltes de cores vivas ou qualquer item que possa refletir a fonte de luz. Os avaliadores devem ainda se adaptar ao ambiente por pelo menos 2 minutos antes do início da avaliação [18]. A escala cinza está sendo solicitada como item de consumo para este projeto.

3.4. Metodologia para buscar novas parcerias

As metodologias de tingimento natural desenvolvidas neste projeto serão divididas em dois grupos: (1) metodologias com perspectiva de depósito de patente e (2) metodologias de domínio público (que já foram desenvolvidas e passaram por processos de adaptação). As metodologias que serão depositadas em patente serão mantidas em sigilo. Para apresentação das metodologias de domínio público, buscaremos parcerias com ONGs e institutos vinculados ao mercado têxtil e/ou com apelo sustentável que financiem ou apoiem projetos de pesquisa e sociais. Selecionamos o Instituto Lojas Renner, o Instituto C&A e o Instituto Brasil Ambiente, que tem como diretor o Dr. Sabetai Calderoni, já parceiro em outros projetos. Também buscaremos parceria com o SUS TEXMODA, vinculado à USP e coordenado pela Prof^a Dra. Francisca Dantas Mendes. O contato será realizado pelo grupo de professoras

pesquisadoras por e-mail e, após isso, serão seguidos os fluxos para oficialização das parcerias indicadas pelas futuras parcerias.

Por se tratar de um projeto de inovação, buscaremos também parcerias internacionais, como por exemplo, o CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (<https://www.csic.es>). Trata-se da maior instituição pública dedicada à pesquisa na Espanha e a terceira maior da Europa. A coordenadora do projeto desenvolveu o doutorado sanduíche no CSIC e realizou um projeto em parceria na rede de carbono, mantendo até hoje relações com o centro, que está sempre aberto a integrações internacionais.

4. Etapas de execução do projeto com respectivo cronograma de atividades para uma previsão de 12 meses, a contar do recebimento dos itens de consumo

4.1. Etapas de Execução do projeto:

- I. Pesquisa bibliográfica e capacitação de formação em técnicas de processo de tingimento.
- II. Preparo de materiais, soluções e reagentes
- III. Busca de estabelecimentos comerciais para a doação de resíduos/credenciamento e organização da coleta dos resíduos
- IV. Desenvolvimento das técnicas de tingimento natural em tecidos conforme metodologia (desenvolvimento de processos de extração /fixação e solidez da cor), início da escrita do e-book
- V. Busca de parcerias na área têxtil
- VI. Elaboração, divulgação dos resultados, elaboração do relatório e depósito de patentes (quando cabível)

4.2. Cronograma de atividades

	trim 1	trim 2	trim 3	trim 4	trim 5	trim 6	trim 7	trim 8	trim 9	trim 10	trire 11	trim 12
Etapas												
I. (a) Pesquisa bibliográfica. (b) Capacitação de formação em técnicas de processo de tingimento.	X (a)	X (b)	X (b)	X (b)	X (b)	X (b)	X (b)	X (b)				
II. Preparo de materiais, soluções e reagentes.	X	X										
III. Busca de estabelecimentos comerciais para a doação de resíduos/credenciamento e organização da coleta dos resíduos		X	X									
IV. (a)Desenvolvimento das técnicas de tingimento natural em tecidos conforme metodologia, (b)escrita do e-book				X (a)	X (a)	X (a)	X (a) (b)	X (a) (b)	X (a) (b)	X (a) (b)	X (b)	X (b)
V. Busca de parcerias para apresentação dos tingimentos desenvolvidos									X	X		
VI. Divulgação dos resultados, elaboração do relatório e início do depósito de patentes									X	X	X	X

trim = Trimestre

5. Produtos esperados como resultados da execução do projeto

Os principais produtos esperados são, no mínimo, oito cores de tingimento em tecido padronizado (verde, amarelo, rosa, nude, laranja, marrom, azul e cinza), obtidas a partir dos produtos naturais (casca de cebola amarela, roxa e feijão preto), utilizando mordentes naturais como Cloreto de sódio e tanino, e avaliando a variação em meios ácido, básico e neutro, além de realizar testes de solidez da cor. Considerando o número

restrito de patentes publicadas (13 encontradas nas plataformas Espacenet, Patentscope e no Google Patents), pretendemos depositar pelo menos duas patentes dos tingimentos inovadores desenvolvidos. Esperamos também escrever um e-book (com cerca de 50 páginas e possuindo ISBN) com as técnicas de tingimento reproduzidas com melhorias e as técnicas desenvolvidas que não forem designadas para depósito de patentes.

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

O potencial inovador da proposta está na união dos conhecimentos do sustentabilidade, química e mercado têxtil, com reaproveitamento de descartes (como cascas de cebola e alimento com data de validade expirada (feijão preto), ressignificando o uso e descarte de materiais e restos de alimentos, transformando-os em corantes de baixo custo para a confecção de novos produtos, diminuindo os impactos ao meio ambiente e danos à saúde, valorizando o conceito de *slow fashion*.

As técnicas que serão desenvolvidas neste projeto contribuirão para a literatura dos tingimentos naturais, que, apesar de serem uma técnica ancestral, possuem poucas novas metodologias e estudos científicos, tornando essencial o desenvolvimento da área na contemporaneidade. Além disso, espera-se que os resultados inovem as metodologias de tingimento em tecidos com corantes naturais, reduzindo os impactos ambientais, adotando os princípios de "slow fashion" como forma de trabalho, estimulando o consumo consciente e acessível, o reaproveitamento de resíduos que seriam descartados em aterros sanitários e/ou lixões, e humanizando a cadeia produtiva da moda.

Considerando o objetivo de depósito de patentes neste projeto, foi realizado um levantamento de patentes que envolvem a extração de corantes a partir da casca de cebola (amarela e roxa) e do feijão preto. Foram encontradas apenas treze patentes, todas depositadas por empresas chinesas, provavelmente devido ao fato de que a técnica de tingimento natural já tenha sido estabelecida na China desde 4000 A.C. a 3000 A.C. A maioria dos métodos de extração encontrados nas patentes utiliza misturas de água com outros solventes, ou apenas solventes orgânicos como etanol, isopropanol, ácido e éter químicos para a extração, bem como mordentes como cloreto de alumínio, sulfato de alumínio, sulfato de potássio e alúmen. Para os métodos de tingimento com feijão preto, foram encontradas patentes que utilizam a extração com ácido cítrico-etanol, 2-(N-morfolino)etanossulfônico em 0,01 - 0,5 mol/L ácido acético e acetato de sódio. As patentes foram pesquisadas nas plataformas gratuitas: Espacenet,

Patentscope e Google Patents e estão registradas com os números: CN110791120A, CN104073022A, CN110894691A, CN108677559A, CN105400231A, CN104693833A, CN107312356A, CN108165047A, KR101001001B1, CN106638027A, CN106592272, CN19337407A, CN104059383 [20-32]. Em geral, as patentes apresentam todo o processo de tingimento, considerando as etapas a serem realizadas até o produto final. Entretanto, cada processo é diferenciado em alguns aspectos, onde cada requerente propõe determinadas mudanças em relação ao tecido utilizado no processo e à matéria-prima utilizada para criar o corante. Levando essa característica em consideração, o pequeno número de patentes depositadas para os corantes selecionados e a grande maioria que utiliza algum tipo de solvente orgânico ou mordentes que não são naturais, os processos de tingimento que serão propostos neste trabalho apresentam grande potencial de depósito de patente. Isso ocorre porque os novos métodos que serão desenvolvidos neste projeto visam processos ambientalmente amigáveis, utilizando resíduos alimentares, água, controle de temperatura e mordentes naturais.

Dentro dessa visão de inovação tecnológica, pretendemos também propiciar a formação de recursos humanos nas áreas de química medicinal, farmácia, tecnologia em alimentos, toxicologia analítica e biomedicina vinculados aos cursos da UFCSPA. Os processos de tingimento natural desenvolvidos e padronizados, priorizando os princípios do slow fashion, estão alinhados com as ações de desenvolvimento sustentável descritas nos objetivos da agenda 2030, tais como saúde e bem-estar (Objetivo 3), água potável e saneamento (Objetivo 6), trabalho decente e crescimento econômico (Objetivo 8), indústria, inovação e infraestrutura (Objetivo 9) e ação contra a mudança global do clima (Objetivo 13) [33].

Dentro dos produtos esperados descritos no item 5, que são considerados inovadores, a divulgação ocorrerá na forma de artigos científicos, participação em eventos vinculados à área de materiais e têxtil, além de um e-book ilustrativo com as metodologias desenvolvidas, bem como a inserção em no podcast “*PodChem* – Falando sobre Química e Ciência para a Promoção da Autonomia e do Senso Crítico na Sociedade”. Também será avaliado o depósito de patente, se cabível.

7) Orçamento:

Tabela 2: Discriminação dos materiais

Item	Valor utilitário (R\$)	Valor total (R\$)
Cobo de Béquér	279,99	559,98
Micro pipetas	245,90	1229,50
Ponteiras	272,80	1364,00
Escala cinza	2993,00	2993,00
Buretas automáticas	909,96	4549,90
Valor total:		10.696,38

O projeto será realizado no laboratório de farmacociências, sala 405, prédio 3. O laboratório de farmacociências possui todos os equipamentos necessários para a realização do projeto. O referido projeto foi contemplado com o edital Edital PROPPG nº 24/2023 de 16 de janeiro de 2023, que permitirá a compra dos materiais (tabela elencados para a realização do projeto).

Referências

1. ABNT. NBR ISO 105-C06:2010. Têxteis - Ensaios de solidez da cor - Parte C06: Solidez da cor à água em tecidos tingidos. Rio de Janeiro, 2010.
2. ABIT. Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/>> Acesso em: 29 mar. 2023.
3. ECYCLE. Poluentes da indústria têxtil. Disponível em: <https://www.ecycle.com.br/poluentes-da-industria-textil/>. Acesso em: 29 mar. 2023.
4. JORNAL DA USP. O modelo 'fast fashion' de produção de vestuário causa danos ambientais e trabalho escravo. Jornal da USP, 19 set. 2019. Disponível em: <https://jornal.usp.br/atualidades/o-modelo-fast-fashion-de-producao-de-vestuario-causa-danos-ambientais-e-trabalho-escravo/>. Acesso em: 29 mar. 2023.
5. WRIGHT, Stephanie L.; KELLY, Frank J. Plastic and human health: a micro issue?. Environmental science & technology, v. 51, n. 12, p. 6634-6647, 2017.. Disponível em:

- https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.7b00423?casa_token=3tzSq6ACO3wAAAAA:G9KDdU4fXZIL8KngePtoOToOuY2iqYMIpNyYxBkETRwYogKNjkvyZxrVB0LvqfOrRTDHfjANJ2ZTU2yM.. Acesso em: 01 out. 2022.
6. COX, Kieran D. et al. Correction to human consumption of microplastics. *Environmental Science & Technology*, v. 54, n. 17, p. 10974-10974, 2020.
 7. WRIGHT, Stephanie L.; KELLY, Frank J. Plastic and human health: a micro issue?. *Environmental science & technology*, v. 51, n. 12, p. 6634-6647, 2017.
 8. PRATA, Joana Correia et al. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the total environment*, v. 702, p. 134455, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719344468?casa_token=ehXcsOD7RGIAAAAA:rNdrhqEldUmRxKNtVGmTesD9iEff525VIVinrwkzDDN_IVZec5WGW8Vv8mDwRXrxmJRsr14OdHs>. Acesso em: 01 out. 2022.
 9. FORUM FOR THE FUTURE. Fashioning Sustainability. Forum for the Future, [s.d.]. Disponível em: <http://www.forumforthefuture.org/project/fashioning-sustainability/overview>. Acesso em: 29 mar. 2023.
 10. POOKULANGARA, Sanjukta; SHEPHARD, Arlesa. Slow fashion movement: Understanding consumer perceptions—An exploratory study. *Journal of retailing and consumer services*, v. 20, n. 2, p. 200-206, 2013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969698912001506?casa_token=rUJydz-Hs2IAAAAA:CIKKicYarUPuEZnPx7Al0rkVV6PKJiEL3JgFKtE4hD9AF5shUbAHtShfr12ggPBFodRU6igu764>. Acesso em: 27 set. 2022
 11. ANICET, Anne; RÜTHSCHILLING, Evelise Anicet. Relações entre moda e sustentabilidade. *Anais do 9º Colóquio de moda*, 2013. Disponível em: <http://www.coloquiomoda.com.br/anais/Coloquio%20de%20Moda%20-%202013/ARTIGOS-DE-GT/Artigo-GT-Moda-e-Sustentabilidade/Relacoes-entre-moda-e-sustentabilidade.pdf>> Acesso em: 27 set. 2022.
 12. ZOLLINGER, H. *Color Chemistry: Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. 2nd rev. edn. Weinheim: VCH, 1991.

13. PEREIRA, G. S. Introdução à tecnologia têxtil. Apostila do curso têxtil em malharia e confecção, módulo II. Centro Federal de Educação Tecnológica de Santa Catarina, Unidade de Ensino Araranguá, 2010.
14. ABNT. NBR ISO 105-A02: Têxteis – Ensaio de solidez da cor – Parte A02: Instrumentos de ensaio para ensaios de solidez da cor à luz. Rio de Janeiro, 2007.
15. ISO 105-A02: Textiles -- Tests for colour fastness -- Part A02: Instrumental assessment of change in colour for determination of grey scale rating. Geneva, Switzerland, 2014.
16. DIN EN 20105-A02: Textiles – Tests for colour fastness – Part A02: Instrumental assessment of change in colour for determination of grey scale rating. Berlin, Germany, 1993.
17. ASTM D2616: Standard Test Method for Evaluation of Visual Color Difference With a Gray Scale. West Conshohocken, PA, 2021.
18. Testex Textile, Solidez da Cor - O Guia Final, Disponível em: <https://www.testextextile.com/pt/solidez-da-cor-o-guia-final/>. Acesso em: 29 mar. 2023.
19. ASTM International. ASTM D 1729-96: Standard Practice for Visual Appraisal of Colors and Color Differences of Diffusely-Illuminated Opaque Materials. West Conshohocken, 1996.
20. CN110791120A. Method for preparing natural dye from yellow onion skins and its application in dyeing cotton fabrics. 2020. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/069914718/publication/CN110791120A?q=pn%3DCN110791120A>. Acesso em: 29 mar. 2023.
21. CN104073022A. Method for extracting natural plant dye. 2014. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/050370840/publication/CN104073022A?q=pn%3DCN104073022A>. Acesso em: 29 mar. 2023.
22. CN110894691A. Method for preparing natural dye from fruit skins of kiwi fruit. 2019. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/066798604/publication/CN110894691A?q=pn%3DCN110894691A>. Acesso em: 29 mar. 2023.

23. CN108677559A. Method for preparing natural plant dye from purple sweet potato peel. 2018. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/061821220/publication/CN108677559A?q=pn%3DCN108677559A>. Acesso em: 29 mar. 2023.
24. CN105400231A. Method for preparing natural dye from mulberry leaves. 2016. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/054558413/publication/CN105400231A?q=pn%3DCN105400231A>. Acesso em: 29 mar. 2023.
25. CN104693833A. Extraction method of onion skin dye liquor, the onion skin dye liquor and application of the onion skin dye liquor in protein textiles. 2015. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN104693833A/en>. Acesso em: 29 mar. 2023.
26. CN107312356A. Method for preparing natural dye from chrysanthemum flowers. 2017. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/059950083/publication/CN107312356A?q=pn%3DCN107312356A>. Acesso em: 29 mar. 2023.
27. CN108165047A. Method for preparing natural dye from mulberry fruits. 2018. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/061502719/publication/CN108165047A?q=pn%3DCN108165047A>. Acesso em: 29 mar. 2023.
28. KR101001001B1. Method for producing natural pigment using cotton waste. 2010. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/KR101001001B1/en>. Acesso em: 29 mar. 2023.
29. CN106638027A. Method for dyeing wool fabrics by natural dye extracted from black bean peels. 2017. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN106638027A/en>. Acesso em: 29 mar. 2023.
30. CN106592272A - LI, Y. (2017). Method for producing polymeric dye and polymeric dye obtained thereby. [Patente de invenção]. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN106592272A/en>. Acesso em: 29 mar. 2023.
31. CN19337407A - ZHANG, H. (2019). Modified starch dye and preparation method thereof. [Patente de invenção]. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/CN19337407A/en>. Acesso em: 29 mar. 2023.

32. CN104059383A - SUN, J. (2014). Plant extract dye and preparation method thereof. [Patente de invenção]. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN104059383A/en>. Acesso em: 29 mar. 2023.

33. UDN. Agenda 2030. Disponível em: <https://www.undp.org/sustainable-development-goals?utm_source=EN&utm_medium=GSR&utm_content=US_UNDP_Paid_Search_Brand_English&utm_campaign=CENTRAL&c_src=CENTRAL&c_src2=GSR&gclid=CjwKCAjw7eSZBhB8EiwA60kCW6DjQLD5DHshtECiQVm3PWjka7CbPhn3RxqAGC-aFuCbj83NsTzMdBoCmpUQAvD_BwE> Acesso em: 02 março 2023.

Explorando a biologia do inseto *Galleria mellonella* para o desenvolvimento de novos agentes contra bactérias multirresistentes

Proponente: Prof. Dr. Danielle da Silva Trentin

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)
Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Laboratório de Microbiologia Molecular
Grupo de Pesquisa em Bacteriologia e Modelos Experimentais Alternativos
(BACMEA)

Porto Alegre, fevereiro, 2022

Dados do proponente

Nome: Danielle da Silva Trentin

CPF: 007.557.010-62

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3005629333520779>

Instituição onde será desenvolvido o projeto: UFCSPA

Laboratório: Microbiologia Molecular

Grupo de Pesquisa: Bacteriologia e Modelos Experimentais Alternativos (BACMEA)

Equipe executora

Prof. Dr. Danielle da Silva Trentin - UFCSPA

Prof. Dr. Denise Brentan da Silva - UFMS

Dr. Gabriela Messias Miranda Menezes – PPGBio - UFCSPA

Letícia Feliciani da Luz – PPGBio - UFCSPA

Gabriela Nascimento Lelis – IC - UFCSPA

Proposta de pesquisa:

Explorando a biologia do inseto *Galleria mellonella* para o desenvolvimento de novos agentes contra bactérias multirresistentes

Justificativa:

O crescente aumento no número de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes e as consequências a elas atribuídas são preocupações constantes no mundo todo. A taxa de mortalidade e os custos financeiros relacionados às infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos são consistentemente superiores do que os relacionados às infecções causadas por bactérias sensíveis aos antimicrobianos¹. Além disso, estima-se que **até 2050 mais de 10 milhões de pessoas irão morrer anualmente** se a resistência aos antimicrobianos for mantida no nível atual¹. Em contraste, nos últimos **20 anos, apenas duas novas classes de antibacterianos foram aprovadas**², tornando evidente a necessidade por novas opções terapêuticas. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elegeu patógenos prioritários no intuito de guiar a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibacterianos³. No entanto, permanece ainda baixo o número de agentes antibacterianos em estudos clínicos, e a maioria destes não apresenta novos mecanismos de ação, como apontado no relatório do mesmo órgão em 2019³.

Desde 2008 tenho trabalhado com produtos naturais e sintéticos na descoberta e no desenvolvimento de novos compostos antibacterianos, os quais inibem a viabilidade das bactérias⁴, e de compostos capazes de atenuar a virulência bacteriana, tais como a produção de biofilme, de toxinas e de pigmentos, sem inibir o crescimento do patógeno^{5,6}. A perspectiva da utilização de moléculas da

¹ OMS (WHO) - World Health Organization. The Review on Antimicrobial Resistance - Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014.

² Tacconelli, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis.** 18, 318-327, 2018.

³ OMS (WHO) – World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, 2019.

⁴ **Trentin, D.S.**, et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One.** 8(6):e66257, 2013.

⁵ **Trentin D.S.** et al. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Sci Rep.** 5:8287, 2015.

biodiversidade para a geração de materiais anti-infectivos, através da inibição de fatores de virulência bacterianos, culminou com a Menção Honrosa no Prêmio CAPES de Tese, na área de Farmácia (2014). Nesta abordagem alternativa de controle de micro-organismos, conhecida como terapia antivirulência, a pressão evolutiva para o desenvolvimento de resistência é, potencialmente, mais suave do que nas terapias antimicrobianas clássicas⁷. O bezlotoxumabe, um anticorpo antitoxina, é exemplo de agente antivirulência atualmente aprovado para uso humano em infecções causadas por *Clostridium difficile*³. Neste sentido, compostos antivirulência podem ser utilizados como fármacos ativos ou em combinação com antibacterianos já estabelecidos, prolongando a vida útil destes. A terapia combinada de antimicrobianos é realidade para o tratamento de pacientes com infecções por bactérias multirresistentes, e na pesquisa, estamos obtendo resultados promissores na combinação de antibacterianos e moléculas antivirulência⁸.

Galleria mellonella é um inseto da família Pyralidae e da ordem Lepidoptera. É conhecido como traça grande da cera pois possui as colmeias como habitat natural. Suas larvas têm sido utilizadas como modelo invertebrado alternativo para pesquisa microbiológica, possuindo grande aceitação pela comunidade científica⁹. Nosso grupo de pesquisa é pioneiro no estado do Rio Grande do Sul na criação e implementação de *G. mellonella* como modelo *in vivo* para avaliar a virulência de micro-organismos, bem como atoxicidade e eficácia anti-infectiva de compostos. O ciclo de vida de *G. mellonella* envolve 4 fases: ovo, larva (que compreende até 7 estágios), pupa e mariposa adulta. Após a ovoposição, os ovos ficam expostos alguns dias no ambiente, estando ameaçados por patógenos. Ainda não é conhecida a forma pela qual os ovos de *G. mellonella* são protegidos de micro-organismos, no entanto a literatura aponta que ovos de insetos sejam recobertos por uma serosa que confere resposta antibacteriana de amplo espectro, como reportado

⁶ Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J., **Trentin, D.S.** Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chem Rev.** 116: 9162-9236, 2016.

⁷ Rasko, D.A. & Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov.** 9, 117-128, 2010.

⁸ Pinto, H. B. ; Brust, F. ; Macedo, A. J.; **Trentin, D.S.** The antivirulence compound myricetin possesses remarkable synergistic effect with antibacterials upon multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. **Microb. Pathog.** 149, 1-8, 2020.

⁹ Dinh, H.; Semenec, L.; Kumar, S.S.; Short, F.L.; Cain, A.K. Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age **Pathog. Dis.** 79(2):ftab006, 2021.

para o besouro *Tribolium castaneum*¹⁰. Ainda há a descrição da presença de peptídeo antimicrobiano nos ovos do inseto *Tenebrio molitor*¹¹ e de um esteroide que previne a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em ovos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*¹².

Larvas de lepidópteros possuem “glândulas de seda”, que produzem e excretam a seda, um polímero proteico gelatinoso que solidifica em contato com o ar. A produção ocorre durante toda a fase larval, sendo intensificada no estágio prévio à formação de pupa quando as larvas ficam envoltas em um casulo de seda. A seda é composta por proteínas estruturais, tais como as fibroínas e as sericinas, e por proteínas não estruturais, como as seroínas que possuem potencial antimicrobiano, bem como por outras proteínas com estruturas ou funções desconhecidas. Importaneamente, o papel de proteínas da seda na imunidade do inseto e na proteção contra a degradação microbiana têm sido relatadas^{13,14}. Assim, por razões ecológicas, a seda parece ser produzida por *G. mellonella* como forma de defesa tanto para larvas, por moverem-se através de “tubos de seda” sem atrair a atenção das abelhas, quanto para as pupas, que em estado de latência metabólica e imóveis, protegem-se em casulos de ataques de micro-organismos e abelhas.

Objetivos:

Dada a experiência acumulada em produtos naturais bioativos e no inseto *G. mellonella* e, partindo do pressuposto de que **insetos se protegem da infecção por micro-organismos** ambientais, a presente proposta visa **explorar produtos naturais**, principalmente oriundos de *G. mellonella* para **identificar**, nos ovos e nos casulos de seda, **moléculas com atividade antibacteriana ou antivirulência** frente a **bactérias multirresistentes**. Dentre os objetivos específicos, destaco:

¹⁰ Jacobs, C.G. et al. The extraembryonic serosa is a frontier epithelium providing the insect egg with a full-range innate immune response. **Elife**. 3, 1-21, 2014.

¹¹ Dubuffet, A. et al. Trans-generational immune priming protects the eggs only against gram-positive bacteria in the mealworm beetle. **PLoS Pathog**. 11:e1005178, 2015.

¹² Zimmer, K.R. et al. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. **Environ Microbiol**. 2008-2018, 2013.

¹³ Shaik, H.A. & Sehna, F. Hemolin expression in the silk glands of *Galleria mellonella* in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration. **J Insect Physiol**. 55: 781-787, 2009.

¹⁴ Shaik, H.A. et al, Responses of sericotropin to toxic and pathogenic challenges: possible role in defense of the wax moth *Galleria mellonella*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 227:108633, 2020.

- Avaliar a ação antibacteriana e antivirulência de extratos obtidos de ovos e da seda de *G. mellonella* contra as cepas padronizadas de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* multirresistentes;

- Purificar e identificar as moléculas naturais bioativas;

- Verificar a atividade das moléculas em combinação com antibacterianos;

- Investigar *in vivo* a toxicidade das moléculas isoladas em larvas de *G. mellonella*;

- Avaliar *in vivo* a eficácia das moléculas purificadas, isoladamente e em combinação com antibacterianos, no tratamento da infecção de larvas com *K. pneumoniae* ou *S. aureus*.

Abordagem experimental:

Baseia-se no fracionamento de extratos, especialmente os provenientes de ovos e de casulos de larvas saudáveis ou desafiadas com bactérias autoclavadas, guiado pela atividade biológica (atividade antibacteriana e/ou antivirulência). Inicialmente a avaliação da viabilidade e da virulência bacteriana será realizada *in vitro*, através de ensaios já padronizados em nosso laboratório, utilizando cepas padronizadas de *K. pneumoniae* e *S. aureus* multirresistentes, duas prioridades apontadas pela OMS. Frações bioativas serão purificadas até a obtenção de moléculas puras, as quais terão estrutura química elucidada através de técnicas analíticas, em colaboração já estabelecida com o grupo de pesquisa da Prof. Dr. Denise Brentan da Silva (UFMS). A atividade das moléculas isoladas e em combinação com antibacterianos será determinada *in vitro* e confirmada *in vivo*, utilizando larvas de *G. mellonella* como hospedeiro experimental para infecção. O fluxograma apresentado abaixo destaca os principais materiais e métodos que serão utilizados.



Figura 1: Fluxograma da abordagem experimental proposta.

Cronograma

Atividades	Quadrimestre											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Manutenção da criação de <i>G. mellonella</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Coleta ovos e casulos de seda – larvas saudáveis	•	•										
Coleta ovos e casulos de seda – larvas desafiadas	•	•										
Extração aquosa e orgânica		•	•									
Atividades biológicas <i>in vitro</i>			•	•	•		•	•	•	•		
Verificação de natureza proteica				•	•							
Fracionamento bioguiado e purificação por técnicas cromatográficas					•	•	•	•	•			
Elucidação estrutural									•	•		
Toxicidade e atividade biológica <i>in vivo</i>										•	•	•

Orçamento

Itens consumíveis	Valor (R\$)
Alimentação artificial e potes para criação de larvas de <i>G. mellonella</i>	2.500,00
Meios de cultura microbiológicos e antibacterianos (Meropenem, ceftazidima, oxacilina, vancomicina)	5.000,00
Materiais descartáveis (Placas de 96 poços, placas de Petri, ponteiras, alças microbiológicas, eppendorfs, tubos tipo Falcon)	4.000,00
Materiais para extração e caracterização de compostos (Solventes orgânicos, resinas para separação cromatográfica, enzimas)	10.000,00
Seringas tipo Halminton (Necessárias para realizar as injeções nas larvas de <i>G. mellonella</i>)	500,00
Total	R\$ 22.000,00

Fontes financiadoras

Este projeto recebe aporte financeiro em prol do desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação do País através da Chamada CNPq Nº 4/2021 - Bolsas de Produtividade em Pesquisa – PQ (processo: 308617/2021-5) e será submetido como proposta em futuros editais de agências de fomento.

Resultados esperados

- Identificação de moléculas com novas vias de ação frente a bactérias multirresistentes.
- Obtenção de moléculas ativas em monoterapia ou em combinação com antibacterianos já estabelecidos, prolongando a vida útil destes.
- Formação de recursos humanos de qualidade com habilidades para desenvolvimento de projetos multidisciplinares e com modelos *in vivo* alternativos, incluindo iniciação científica e pós-graduação nível mestrado e doutorado.
- Produção e divulgação de conhecimento novo através de publicações de artigos científicos em periódicos internacionais de *qualis* A1 e A2.
- Cooperação científica entre grupos de pesquisa da UFCSPA e o Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM) da UFMS.

EDITAL FAPERGS 09/2023
PROGRAMA PESQUISADOR GAÚCHO – PqG

Faixa B

Projeto de Pesquisa Científica

**Utilização de nanopartículas cúbicas de monoleína para o tratamento do glioblastoma tendo
Nek1 e Nek4 como alvos**

Proponente: Dinara Jaqueline Moura

Palavras chaves: Glioblastoma, Nek1, Nek4, resposta a danos ao DNA, monoleína, cubossomas,
sistema de entrega de drogas

Porto Alegre, março de 2024.

a) Título

Utilização de nanopartículas cúbicas de monoleína para o tratamento do glioblastoma tendo Nek1 e Nek4 como alvos

Equipe:

Dra. Dinara Jaqueline Moura (Coordenadora do Projeto): Laboratório de Genética Toxicológica, Professora Adjunta do Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Dra. Elizandra Braganhol: Laboratório de Pesquisa Translacional em Câncer e em Poluição Ambiental, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Dra. Monique Deon: Laboratório de Farmacociências, Professora Adjunta do Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Dr. Tiago Espinosa Oliveira: Laboratório de Bioinformática Estrutural, Modelagem Molecular e Simulação de Biosistemas, Professor Adjunto do Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

MSc. Tamira Rempel da Rosa: Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

MSc. Rick Shandler Rodrigues da Cunha: Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - RS.

Ana Carolina Silva Pinheiro: Estudante do curso de Biomedicina e iniciação científica no Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Luiza Feijo Silva: Estudante do curso de Biomedicina e iniciação científica no Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Victória Rapack Jacinto Silva: Estudante do curso de Biomedicina e iniciação científica no Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

b) Caracterização do problema:

O câncer está entre as principais preocupações de saúde pública. Considerando a diversidade de tipos celulares presentes no conjunto tumoral, a comunidade científica enfrenta um desafio significativo não apenas na compreensão abrangente das vias bioquímicas afetadas, mas também na busca por abordagens terapêuticas que alcancem eficácia com taxas reduzidas de efeitos colaterais. Esse desafio é facilmente evidenciado quando observados os dados epidemiológicos da doença em anos recentes. Conforme a World Health Organization (WHO), o câncer foi responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020, o que representa em torno de uma em cada seis mortes, desta forma ocupando o 2º lugar entre as principais causas de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares (WHO, 2020). De acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC, 2020), para o período entre 2020 e 2040, é esperado um total de 30,2 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, representando um aumento de aproximadamente 60% em relação ao número atual, além de 19,3 milhões de óbitos.¹

Estimativas indicam que a incidência de câncer deverá aumentar em quase 80% até 2040, acompanhada por um crescimento de 83% nas taxas de mortalidade. Em geral, a incidência e a

letalidade do câncer estão em ascensão globalmente, impulsionadas tanto pelo envelhecimento quanto pelo aumento populacional, bem como pelas mudanças nos padrões de risco da doença, especialmente aqueles relacionados ao desenvolvimento socioeconômico.²

Ao se concentrar exclusivamente nos tumores que afetam o sistema nervoso central (SNC), os gliomas representam 28% de todos os tumores primários cerebrais e 80% dos tumores malignos deste sistema.³ De maneira geral, o termo glioma engloba uma variedade de tumores gliais, tanto benignos quanto malignos e, apesar de sua incidência relativa ser baixa, apresentam um prognóstico desfavorável e impacto negativo na qualidade de vida e função cognitiva dos pacientes.⁴ Estes tumores são categorizados com base em sua histopatologia, e os astrocitomas de grau IV, conhecidos como glioblastomas (GBM), são os mais agressivos, representando a maioria dos casos entre todos os gliomas, e apresentando-se como a forma mais severa e com o prognóstico mais desfavorável.⁵ A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia à base de temozolomida são opções de tratamento fundamentais no manejo clínico. No entanto, a maioria dos gliomas são cirurgicamente irresssecáveis e, quando diagnosticados em estágio avançado, o nível de resistência à quimioterapia convencional aumenta. Além disso, pelo difícil acesso à radioterapia, os gliomas tornam-se um dos cânceres mais difíceis de tratar. Mesmo com a utilização das três medidas terapêuticas e apesar dos recentes desenvolvimentos nas terapias antitumorais, pacientes com GBM tem uma sobrevivência média de apenas 14,6 meses a partir do diagnóstico⁶. Neste contexto, o entendimento de mecanismos de reparo de DNA e expressão de proteínas envolvidas na resistência tumoral fazem parte das estratégias fundamentais para identificar novas abordagens terapêuticas no tratamento de GBM.

Nek1 (NIMA-related Kinase 1) é um membro da família das Nek cinases, atuando em mitose e reparo de danos ao DNA⁷⁻¹⁰. A proteína Nek1 é necessária para ativar as vias de resposta a danos no DNA (DDR) por meio da proteína ATR¹⁰. A Nek1 também parece interagir com outras proteínas relacionadas a danos ao DNA, incluindo Rad54 e Mre11. Mais recentemente, Higelin et al. demonstraram que o comprometimento do maquinário DDR causado pela mutação de NEK1 em motoneurônios de pacientes com esclerose lateral amiotrófica leva ao acúmulo de danos ao DNA e aumento da morte celular¹¹, destacando o papel dessa proteína na DDR. Em um contexto de câncer, Nek1 foi associada à progressão do câncer de próstata, diminuição da sensibilidade à terapia de danos ao DNA no carcinoma de células renais, redução da sobrevida livre de doença no câncer cervical, malignidade e agressividade de cânceres de tireoide e resistência a TMZ em células GBM.¹³⁻¹⁷ Em células de glioma, Zhu et al. sugeriram que Nek1 pode ser um novo e importante alvo, uma vez que seu papel na malignidade do GBM está relacionada à promoção do crescimento celular e imunoresistência¹⁸. Publicação recente do nosso grupo de pesquisa reforça o papel de Nek1 no tratamento de GBM demonstrando que a inibição de Nek1, concomitante com o tratamento com TMZ, reduz significativamente a viabilidade de células de GBM, além de diminuir o tamanho tumoral em modelo animal¹⁹. Dados ainda não publicados por nosso grupo de pesquisa corroboram ainda mais com a tese e apontam que o knockout de Nek1 em células de glioblastoma leva a sensibilização ao tratamento com TMZ e com o radiomimético zeocina (Morás et al., em preparação). Ainda, em análises *in silico* usando dados de glioblastoma do *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* e o *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2)* identificamos uma forte correlação entre as proteínas Nek1 e Nek4.

Nek4 desempenha um papel na regulação dos microtúbulos, na senescência replicativa e na DDR. A supressão de NEK4 atrasa a entrada na senescência replicativa e leva à parada defeituosa do ciclo celular em resposta a danos no DNA.^{20,21} Essas deficiências na senescência e na DDR estão comumente associadas ao acúmulo de mutações e, não surpreendentemente, à oncogênese. Nek4 foi associado a estágios de câncer colorretal e metástase de câncer de pulmão.^{22,23}

A descoberta de alvos genéticos e proteicos potentes estimulou o desenvolvimento clínico de novas abordagens terapêuticas para tratar pacientes com GBM. No entanto, várias dessas abordagens

falham em oferecer melhorias no prognóstico dos pacientes. Um dos motivos que justificam o fracasso clínico dessas abordagens pode ser a incapacidade dos vetores convencionais de atingir o local do tumor por meio de tumores altamente disseminados e de atingir alvos oncológicos que estão contribuindo para a resistência do tumor²⁴.

No contexto dos tumores cerebrais, a localização anatômica desempenha um papel significativo na resistência ao tratamento. A BHE, composta de uma complexa rede angiogênica e junções celulares extremamente apertadas e restritivas, dificulta a entrega de moléculas em níveis terapêuticos, desta forma restringindo a eficácia da quimioterapia.²⁵ Desta forma, apesar da TMZ constituir o padrão-ouro para o tratamento do GBM, diversos obstáculos como a natureza invasiva do tumor e sua resistência inerente e adquirida podem levar a resultados insatisfatórios. Tais complexidades ressaltam a urgência em se desenvolver novas estratégias terapêuticas para melhorar a eficácia do tratamento desta doença.

Os Drug Delivery Systems (DDS) são empregados principalmente para obter controle preciso em termos de tempo e local durante a administração de fármacos e/ou agentes biológicos. De um modo geral, estes sistemas permitem que moléculas tenham seus perfis de liberação modulados e que sejam liberadas de maneira sítio-específica por meio de nanocarreadores com tamanhos variando entre 1 e 500 nm, melhorando a segurança e eficácia do tratamento, e a adesão do paciente em razão da minimização dos efeitos colaterais e do melhor manejo dos esquemas de administração.²⁶ Tais modificações são atingidas por meio de alterações do perfil farmacocinético intrínseco das moléculas pelas propriedades da matriz do sistema, incluindo sua composição e suas características de superfície. Além disso, os DDS possibilitam a administração de fármacos potentes, mas de natureza instável, com mínimas flutuações de doses, garantindo a uniformização prolongada da sua concentração plasmática aliada à uma menor incidência de toxicidade.²⁷

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com álcool polivinílico (PVA), uma escolha viável para DDS por ser biodegradável e apresentar baixíssima toxicidade^{19,28}. Produzimos, por exemplo, nanofibras de dacarbazina-PVA para tratar GBM, e esta formulação mostrou grandes propriedades mecânicas e de entrega, melhorando a eficácia *in vitro* da dacarbazina²⁸. Adicionalmente, o uso das microfibras de PVA contendo temozolomida e o inibidor da proteína Nek1 melhorou a eficácia do tratamento *in vitro* e *in vivo* quando comparado com a quimioterapia convencional, com as formulações apresentando uma elevada carga de fármaco, o que prolongou a liberação do mesmo, melhorando os efeitos antitumorais do iNek1 e da temozolomida.¹⁹

Na busca pelo desenvolvimento de novos sistemas de entrega de fármacos com produções que possam ser escalonáveis e com grande possibilidade de atingir o mercado as nanopartículas lipídicas possuindo estrutura cúbica têm chamado a atenção devido à sua singularidade. Essas nanopartículas cúbicas podem ser facilmente preparadas apenas misturando lipídios como a monoleína com poloxâmero e água. Sua estrutura única composta por bicamadas lipídicas contínuas que separam canais de água interpenetrantes permite que essas nanopartículas acomodem drogas hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas e as liberem de maneira controlada. Portanto, essas nanopartículas cúbicas com seu pequeno tamanho de partícula e liberação controlada de medicamentos poderiam ser consideradas como transportadores favoráveis para medicamentos antitumoral.

Considerando a necessidade de buscar novos alvos moleculares como estratégias de tratamento de tumores e as características particulares do tecido cerebral, este projeto tem como objetivo caracterizar o envolvimento conjunto das proteínas Nek1 e Nek4 no contexto dos GBM e desenvolver formulações inovadoras a base de monoleína com estrutura de cubossomo como carreadoras de inibidores destas proteínas combinadas com a temozolomida.²⁹⁻³¹

c) Objetivos e metas

O objetivo geral deste projeto é investigar a relação entre as proteínas Nek1 e Nek4 no contexto de glioblastomas, e também como alvo no tratamento de glioblastoma em uma formulação inovadora, usando três abordagens principais: (i) investigar a correlação das proteínas Nek1 e Nek4 a partir de bancos de dados; (ii) investigar o comportamento das proteínas Nek1 e Nek4 na resposta celular aos danos no DNA em linhagens proficientes e deficientes nessas proteínas; (iii) desenvolver e caracterizar cubossomas de monoleína contendo temozolomida, e os inibidores das proteínas Nek1 (iNek1) e Nek4 (iNek4), e investigar o potencial terapêutico destas formulações na modulação negativa do crescimento de gliomas, em modelos *in vitro*.

Serão metas deste projeto:

- Avaliar a correlação das proteínas Nek1 e Nek4 a partir de dados de expressão depositados em bancos de dados de amostras de gliomas.
- Avaliar o fenótipo por medida de viabilidade, proliferação e morte celular na linhagem U87-NEK4 KO após tratamento com TMZ.
- Avaliar a formação e reparo de quebras duplas, pela medida de expressão das proteínas γ H2AX e 53BP1, ao longo das 24 horas de tratamento com temozolomida, nas linhagens U87-NEK1 KO, U87-NEK4 KO e U87-WT que expressam a proteína 53BP1 truncada fusionada a mCherry.
- Avaliar o fenótipo por medida de viabilidade, proliferação e morte celular na linhagem U87-WT após tratamento farmacológico com iNek1 e iNek4, em culturas 2D e 3D.
- Avaliar a expressão gênica de *NEK1* e *NEK4* na linhagem selvagem U87 e comparar com a expressão destas proteínas quando da deleção de uma ou de outra nas linhagens.
- Desenvolver um nanocarreador de TMZ e zeocina para ser incorporado nas microfibras.
- Desenvolver novas formulações de monoleína em estrutura de cubossomas contendo TMZ, o iNEK1 e o iNEK4 e avaliar as características destas formulações.
- Determinar a eficiência de encapsulamento de TMZ, iNEK1 e iNEK4 nestas formulações e avaliar a eficácia de liberação destas drogas.
- Determinar a eficácia destas formulações *in vitro*, pela medida de viabilidade e proliferação celular e determinação do tipo de morte celular, em culturas 2D e 3D.

d) Metodologia e estratégia de ação:

Este projeto será executado considerando três estratégias de ação: (i) análises *in silico* de expressão das proteínas Nek1 e Nek4 a partir de bancos de dados como o NCBI e TCGA; (ii) a primeira envolvendo a caracterização da relação das proteínas Nek1 e Nek4 no contexto dos glioblastomas, por meio do uso de linhagens proficientes e deficientes nestas duas proteínas e avaliação do fenótipo, incluindo, análises de viabilidade, proliferação e morte celular, formação de quebras duplas no DNA, expressão de RNA e proteína; (iii) a segunda envolvendo o desenvolvimento e caracterização de cubossomas de monoleína carreando TMZ e os inibidores farmacológicos de Nek1 e Nek4 e avaliação do fenótipo. Em ambas abordagens será utilizada cultura 3D para mimetizar o tecido tumoral.

Serão usadas as seguintes metodologias para o estudo do comportamento das proteínas Nek1 e Nek4:

Análises in silico: com o objetivo de avaliar em bancos de dados a interação entre Nek1 e Nek4 será realizada a busca de estudos de microarray e RNA-seq em bancos de dados de livre acesso como NCBI e TCGA. A análise dos dados será feita utilizando-se de ferramentas disponibilizadas online como GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/>), COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) e TIMER (<http://timer.cistrome.org/>). Os dados que não puderem

ser analisados com estas ferramentas serão analisados com o programa estatístico “R”.

Células: será utilizada a linhagem de glioblastoma U87, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC), assim como a linhagem já construída que é knockout para a proteína Nek4 (U87 Nek1-KO). O Laboratório de Genética toxicológica dispõe de CQB para trabalhar com estas linhagens (423/2016).

Cultura Celular 3D: células serão submetidas à metodologia de *bioprinting* desenvolvida pela Greiner Bio-one®, em que após o plaqueamento as células serão magnetizadas utilizando o Nanoshuttle™-PL e incubadas. Após a incubação, as células serão transferidas para as placas Cell-Repellent GBMO e expostas a uma força magnética através de *drivers* magnéticos posicionados abaixo da placa. A força magnética fará com que as células se agreguem e formem esferóides ao fundo da placa. Após a formação do esferóide, as células serão tratadas com TMZ e iNek1 para a avaliação do fenótipo.

Inibidores farmacológicos: serão utilizados como inibidores farmacológicos (i) o composto Inibidor II de JNK (CAS nº 4129-56-6), um inibidor mimético de ATP, que foi previamente descoberto para inibir a atividade de Nek1 em $71,5\% \pm 0,1\%$ a uma concentração de $50 \mu\text{M}$ ^{19,32} e; (ii) o composto *N*-[2-(substituted-phenyl)ethyl]-6-fluoro-4-quinazolinamines, inibidor de Nek4.³³

Tratamentos: as células serão plaqueadas, tratadas com diferentes concentrações das drogas. Após isso, as células serão submetidas a dois ciclos de tratamento diário por 5 dias e 23 dias de recuperação. Os demais ensaios serão realizados em uma condição basal, após 24 h e 5 dias de tratamento, após 2 dias de recuperação e ao final de cada ciclo.

Viabilidade celular: a viabilidade celular será determinada pelo ensaio de exclusão de Tripan. Após tratamento, um volume celular será incubado com azul de tripan na proporção 1:1 e citotoxicidade será determinada pelo sistema Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). O teste será conduzido de acordo com instruções do fabricante. Além disso, a viabilidade será avaliada pelo ensaio de Vermelho Neutro (VN), este ensaio é baseado na incorporação da sonda de VN pelos lisossomos de células viáveis. Após o tratamento as células serão lavadas com PBS e incubadas com $250 \mu\text{L}$ da solução de VN ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a 37°C por 3 h. Depois disso, as células serão lavadas novamente e incubadas 30 min, protegidas da luz, com a solução de desidessorção (ácido acético: etanol: água, 1:50:49). A absorbância será medida a 590 nm no espectrofotômetro Spectramax M²e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Determinação 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-PE e 7-AAD, de acordo com recomendações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA). Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10.000 eventos serão coletados por amostra.

Avaliação da proliferação celular: este ensaio será conduzido utilizando o kit CellTrace CFSE (Invitrogen) será adicionado. As células serão avaliadas durante 3 dias utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os dados serão analisados utilizando o FlowJo™ (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA).

Avaliação da expressão proteica: as células serão submetidas a uma condição com e sem dano, mediante tratamento com TMZ. A partir disso, as células serão lisadas com tampão de lise (50

mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% DMSO, 1 mM PMSF, inibidor de protease EDTA-free) e a concentração de proteína será mensurada de acordo com método Lowry (Lowry, 1951). Após isso, 50 µg de proteína serão misturados ao tampão de amostra desnaturante e aquecido por 5 min a 100°C. Essa amostra será submetida ao SDS-page, para migração das proteínas de acordo com suas massas. As proteínas serão eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, bloqueadas com albumina e incubadas com anticorpos primários e secundários complexados a peroxidase. O reagente ECL será utilizado para revelação por quimioluminescência.

Expressão gênica: o RNA será extraído de acordo com a recomendação do fabricante do kit de extração Relia Prep™ RNA Cell Miniprep System e a quantificação será determinada por absorbância através do NanoSpec. A transcriptase reversa será utilizada para produção do cDNA e esse será incubado com Taq polimerase e *Fast SYBR® Green Master*, conforme recomendações do fabricante. A reação de PCR se dará pelo sistema *StepOne™ Real-Time PCR* (Heid, 1996).

Imunofluorescência: células serão plaqueadas em lamínulas e após tratamento, serão fixadas com paraformaldeído (4%), lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%). As lamínulas serão bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) e incubadas com anticorpos primários, incluindo anti-Nek1, anti-Nek4, além da coloração com DAPI para marcação do núcleo. A lamínula será montada em uma lâmina e as células serão analisadas no microscópio EVOS FL (Thermo Fisher).

Serão utilizadas as seguintes estratégias para produção, caracterização e avaliação da eficácia das nanopartículas cúbicas:

Preparação de nanopartículas cúbicas (cubossomos): os cubossomos serão preparados conforme descrito anteriormente a partir de monooleína e de poloxamer 407.^{29,30} Brevemente, será adicionado o poloxamer à monooleína fundida, seguido de adição gota a gota a água. O gel cúbico será obtido após agitação desta mistura à temperatura ambiente. A redução do tamanho das partículas deste gel cúbico será realizada transferindo-o para um microfluidizador onde será submetido a um processo de homogeneização por 15 min a 350 bar e 40 °C. Posteriormente, essa mistura homogeneizada será submetida à autoclavagem a 121 °C por 15 min.³¹ As soluções de TMZ, iNek1 e iNek4 serão preparadas como solução estoque e posteriormente misturadas a nanoemulsão preparada, seguido pela transferência da mistura para um agitador de banho-maria. Após o tempo adequado a nanoemulsão será armazenada a (2-8 °C) para atingir o estado sólido das nanopartículas.

Tamanho de partícula e potencial zeta: Os tamanhos de partícula e o potencial zeta das diferentes nanopartículas serão medidos usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK-Worcestershire) onde 10 ml das nanopartículas serão diluídos com 1 ml de água desmineralizada filtrada para medir o tamanho das partículas ou tampão tris 10 mM para medir o potencial zeta. A média de três medições para tamanho de partícula e potencial zeta será calculada. Além disso, os tamanhos das partículas serão avaliados utilizando a técnica de difração a laser (LD) por um coulter LS 230 Particle Sizer (Beckman Coulter, D-Krefeld).

Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-TEM): Cerca de 5 ml de SLNs e cubossomos sem diluição serão adicionados a uma grade perfurada (Quantifoil Micro Tools, Jena, Alemanha) seguido pela imersão das amostras em etano líquido resfriado a 170°C e 180°C em uma caixa criogênica (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemanha). As amostras serão então transferidas com uma unidade de criotransferência (Gatan 626-DH) para serem examinadas usando um microscópio crioeletrônico pré-resfriado (Philips CM120, Holanda).

Difração de raios X de pequeno ângulo de cubossomos: A existência da estrutura cúbica foi examinada medindo a difração de raios X das dispersões de monooleína antes e depois da autoclavagem. As medições foram realizadas durante 1-2 h com uma câmera SWAX (Hecus M.

Braun, Optical Systems GmbH, Graz, Áustria) e um ânodo de tubo de raios X de cobre com dois detectores sensíveis à posição (PSD-50M, M. Braun, Garching, Alemanha).

Estudos de liberação de drogas in vitro: Os estudos de dissolução de drogas serão realizados usando um Distek Model 2500 Dissolution. As amostras serão retiradas em intervalos definidos e medidas por luz ultravioleta em um espectrômetro Shimadzu UV 1280 (Shimadzu). Formulações vazias serão usadas como branco para a leitura do espectrômetro.

Ensaio in vitro: As linhagens celulares C6 e U87 (com e sem Nek1 e Nek4), adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro e do banco American Type Culture Collection (ATCC), serão utilizadas para os experimentos. As linhagens serão mantidas conforme condições sugeridas pelo fornecedor. As células serão plaqueadas, tratadas com as diferentes formulações de cubossomas, contendo temozolomida, iNek1 e/ou iNek4.

Cultura Celular 3D: células serão submetidas à metodologia de *Bioprinting* desenvolvida pela Greiner Bio-one®, em que após o plaqueamento as células serão magnetizadas utilizando o Nanoshuttle™-PL e incubadas. Após a incubação, as células serão transferidas para as placas Cell-Repellent GBMO e expostas a uma força magnética através de *drivers* magnéticos posicionados abaixo da placa. A força magnética fará com que as células se agreguem e formem esferóides ao fundo da placa. Após a formação do esferóide, as células serão tratadas com TMZ e iNek1 para a avaliação do fenótipo.

Viabilidade celular: a viabilidade celular será determinada pelo ensaio de exclusão de Tripan. Após tratamento, 10 uL de suspensão celular será incubado com azul de Tripan na proporção 1:1 e citotoxicidade será determinada pelo sistema Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). O teste será conduzido de acordo com instruções do fabricante. Além disso, a viabilidade será avaliada pelo ensaio de vermelho neutro (VN), conforme descrito anteriormente neste projeto.

Avaliação da proliferação celular: este ensaio será conduzido utilizando o kit CellTrace CFSE (Invitrogen) será adicionado. As células serão avaliadas durante 3 dias utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os dados serão analisados utilizando o FlowJo™ (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA).

Tipo de morte celular: o tipo de morte será avaliado pela marcação com Anexina V-PE e 7-AAD. Após tratamento, células serão coletadas e incubadas com tampão de ligação, Anexina- PE e 7-AAD, de acordo com recomendações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA). Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10.000 eventos serão coletados por amostra.

Análise da incorporação das nanopartículas: as células serão submetidas a diferentes tempos de tratamento com o cubossoma produzido com Rodamina B. Após isso, elas serão fixadas e serão observadas no microscópio de fluorescência (Leica DM2000) no comprimento de onda de 543 nm.

Análise estatística: Os dados quantitativos serão expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP) e a análise estatística será obtida pelo teste t não pareado ou ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey (GraphPad Prism 8.0, La Jolla, CA, EUA). O valor de $P < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

e) Resultados e impactos esperados

Identificar proteínas que possam estar associadas a este tipo tumoral pode ser uma importante ferramenta, especialmente no manejo clínico associado a escolha do tratamento. Nosso grupo de pesquisa vem caracterizando o papel de Nek1 na resposta a tratamentos quimioterápicos em células de glioblastomas, confirmando que esta proteína pode ser um relevante alvo para melhora da resposta a quimioterapia. Entender como o silenciamento desta proteína pode estar influenciando as respostas a danos no DNA tornando as células mais sensíveis aos quimioterápicos

poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de glioblastomas. Além disso, dados do nosso grupo apontam uma correlação importante entre as proteínas Nek1 e Nek4, e ambas apresentam um papel relevante no contexto tumoral, neste contexto a elucidação dos mecanismos celulares de sinalização das moléculas envolvidas neste projeto, agregada a todos os resultados já alcançados até o momento pelo nosso grupo de pesquisa, irá gerar perspectivas sobre novos alvos terapêuticos na etiologia e tratamento do glioblastoma multiforme.

Nanomateriais são utilizados como plataformas de transporte e entrega de moléculas bioativas em diferentes aplicações, com potencial de melhorar a solubilidade, homogeneidade, estabilidade, proteção contra efeitos químicos e biológicos adversos. Esses têm atraído interesse devido às suas propriedades singulares em comparação com materiais convencionais. Nesse contexto, estruturas como lipossomas, tais como os cubossomas encontram suas aplicações na entrega de moléculas bioativas. Nanocarreadores à base de lipídios (cubossomas) recebem um interesse extraordinário por suas aplicações na encapsulação e liberação controlada e direcionada de moléculas bioativas, com capacidade de encapsular componentes com diferentes solubilidades, protegendo uma molécula internalizada de interações indesejadas. Essa característica promove maior estabilidade a compostos hidrofílicos, além da capacidade de incorporar simultaneamente substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, uma propriedade importante para aplicações biomédicas, como na quimioterapia, ao proporcionar um efeito sinérgico.

Com base no exposto acima, de forma resumida, os seguintes impactos podem ser mencionados:

- ✓ Ampliação do conhecimento da ação conjunta das proteínas Nek1 e Nek4 em células tumorais.
- ✓ Entendimento do mecanismo de ação associado ao silenciamento das proteínas Nek1 e Nek4 na resposta positiva a TMZ em células de glioblastoma.
- ✓ Proposição de novos alvos moleculares conjunto a Nek1, como a Nek4, para o tratamento de glioblastoma.
- ✓ Desenvolvimento de nanopartículas biocompatíveis com potencial antitumoral.
- ✓ Utilização de nanoestruturas como forma de aumentar a penetração intracelular de TMZ, bem como prolongar sua liberação.
- ✓ Possibilidade de uma alternativa de tratamento com a inclusão de inibidores proteicos específicos (iNek1 e iNek4) que tragam melhora na sobrevida dos pacientes com glioblastoma.
- ✓ Diminuição dos efeitos adversos dos tratamentos quimioterápicos convencionais, tendo em vista a diminuição da biodistribuição do fármaco.
- ✓ Possibilidade de melhora na sobrevida dos pacientes com glioblastoma com o uso dos nanosistemas.

Cabe destacar que a formação de recursos humanos também é contemplada com este projeto, dois alunos de doutorado desenvolverão este projeto como parte dos seus trabalhos, assim como três alunos de iniciação científica.

Ainda, é oportuno mencionar a participação dos professores Monique Deon e Tiago Espinosa como colaboradores deste projeto, dois jovens pesquisadores, com potencial científico, que estão em fase de consolidação das suas linhas e grupos de pesquisa. A interação com pesquisadores mais experientes como a profa. Dinara Moura, coordenadora do projeto, e a profa. Elizandra, integrante da equipe pode contribuir para esta consolidação.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em revistas da área e em congressos a fim de que o conhecimento gerado com este estudo possa auxiliar outros pesquisadores e clínicos no entendimento deste tipo tumoral extremamente agressivo.

f) Cronograma, riscos e dificuldades

Atividade	1º semestre	2º semestre	3º semestre	4º semestre	5º semestre	6º semestre
Análises in silico	x	x				
Construção da linhagem com a proteína Nek4 silenciada	x	x				
Avaliação do fenótipo do silenciamento das proteínas Nek1 e Nek4 em células de glioblastoma	x	x	x			
Proposição de um modelo de relação das proteínas Nek1 e Nek4 em gliomas			x	x	x	
Produção e caracterização físico-química dos cubossomas	x	x	x			
Análise do efeito do tratamento com nanossistemas sobre o crescimento in vitro dos gliomas		x	x	x		
Redação de manuscritos			x	x	x	x
Elaboração de relatório		x		x		x

Este projeto será desenvolvido na UFCSPA (i) no Laboratório de Genética Toxicológica, que dispõe de estrutura para cultivo celular e técnicas de biologia molecular, (ii) na Unidade Bioanalítica da UFCSPA, que dispõe dos microscópios de fluorescência, IN Cell Analyzer 2000, que permite a captação de imagens visível e fluorescente em um meio com temperatura e CO₂ controlado, e o microscópio invertido EVOS FL com fluorescência, assim como FACS Calibur para as análises de citometria de fluxo, e (iii) no Laboratório de Farmacociências, que dispõe de estrutura para caracterização dos cubossomas.

Os pesquisadores e estudantes envolvidos neste projeto possuem experiência em biologia celular e molecular, assim como, no desenvolvimento de novas formulações. Cabe destacar que recentemente publicamos dois artigos de revisão; no primeiro deles são abordados os principais mecanismos de resistência associado às atuais terapias utilizadas no contexto dos GBM, os motivos de falha de novas drogas testadas clinicamente, as tecnologias existentes para entrega de drogas e as vias de administração alternativas relevantes no contexto do GBM⁵⁶. O objetivo desse artigo foi propor que a associação de sistemas de entrega e rotas alternativas de administração possibilitem novas opções farmacológicas para o tratamento de GBM, principalmente com inibidores da resposta a danos no DNA, aumentando a eficiência dessas estratégias clínicas.²⁵ No segundo artigo de revisão focamos nas nanoestruturas como sistemas de administração de medicamentos para o tratamento do câncer, como elas podem atingir as células tumorais e melhorar a toxicidade in situ e as barreiras que podem enfrentar para alcançar um resultado positivo.³⁴ A construção destes artigos deu maturidade ao nosso grupo para continuidade das pesquisas envolvendo alvos moleculares para o tratamento de

GBMM. Considerando o exposto acima, temos riscos mínimos para execução considerando infraestrutura e pessoal.

g) Orçamento

Entendendo que este projeto trará significativo avanço em termos de estratégias para tratamento de glioblastomas, a um baixo custo em função das parcerias previamente estabelecidas, serão necessários os seguintes reagentes:

Material de Consumo	Valor (R\$)
Reagentes e meios de cultura para cultivo celular	R\$ 13.000,00
Material plástico (garrafas de cultura, placas, eppendorfs, ponteiras)	R\$ 10.000,00
Anticorpos primários (gamaH2AX e anti-Nek4)	R\$ 10.000,00
Drogas quimioterápicas (TMZ, iNek1, iNek4)	R\$ 6.000,00
Kits de reagentes (morte celular, proliferação, vecta shield)	R\$ 6.000,00
TOTAL DESPESAS DE CUSTEIO	45.000,00

Ainda, considerando que o câncer é um problema de saúde pública, resultando em perda da capacidade física, diminuição da qualidade de vida e óbitos, e que este projeto objetiva propor alternativas para o tratamento, o mesmo se encaixa no ODS 3: Saúde e Bem estar.

h) Referências bibliográficas

¹Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024 Jan-Feb;74(1):12-49. doi: 10.3322/caac.21820. Epub 2024 Jan 17. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2024 Mar-Apr;74(2):203. PMID: 38230766.

²Rezende, LFM *et al.* (2019). Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. *Cancer Epidemiology*. vol. 59: 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.01.021>. Acesso em: 22 de setembro de 2022.

³Guntuku, L., Naidu, G. M., Yerra, V. G. Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds. *Current Neuropharmacology*. v. 14, n. 6, p. 567-583, 2016.

⁴Ostrom, Q. T. et al. Current Understanding and Treatment of Gliomas. *Epidemiology of gliomas*. Springer. pp. 1–14, 2015.

⁵Tan, A. C.; Ashley, D. M.; López, G. Y.; Malinzak, M.; Friedman, H. S.; Khasraw, M., Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2020, 70 (4), 299-312.

⁶Ohka, F., Natsume, A., Wakabayashi, T. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int*. ID 878425, 2012.

⁷Patil, M.; Pabla, N.; Ding, H. F.; Dong, Z., Nek1 interacts with Ku80 to assist chromatin loading of replication factors and S-phase progression. *Cell Cycle* 2013, 12 (16), 2608-16.

⁸White, M. C.; Quarmanby, L. M., The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol* 2008, 9, 29.

⁹Liu, S.; Ho, C. K.; Ouyang, J.; Zou, L., Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110 (6), 2175-2180.

¹⁰Spies, J.; Waizenegger, A.; Barton, O.; Sürder, M.; Wright, W. D.; Heyer, W. D.; Löbrich, M., Nek1 Regulates Rad54 to Orchestrate Homologous Recombination and Replication Fork Stability. *Mol Cell* 2016, 62 (6), 903-917.

¹¹Higelin, J.; Catanese, A.; Semelink-Sedlacek, L. L.; Oeztuerk, S.; Lutz, A.-K.; Bausinger, J.; Barbi, G.; Speit, G.; Andersen, P. M.; Ludolph, A. C.; Demestre, M.; Boeckers, T. M., NEK1 loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in ALS patient-derived motoneurons. *Stem Cell Research* 2018, 30, 150-162.

¹²Singh, V.; Jaiswal, P. K.; Ghosh, I.; Koul, H. K.; Yu, X.; De Benedetti, A., Targeting the TLK1/NEK1 DDR axis with Thioridazine suppresses outgrowth of androgen independent prostate tumors. *Int J Cancer* 2019, 145 (4), 1055-1067.

¹³Singh, V.; Jaiswal, P. K.; Ghosh, I.; Koul, H. K.; Yu, X.; De Benedetti, A., The TLK1-Nek1 axis promotes prostate cancer progression. *Cancer Lett* 2019, 453, 131-141.

¹⁴Singh, V.; Khalil, M. I.; De Benedetti, A., The TLK1/Nek1 axis contributes to mitochondrial integrity and apoptosis prevention via phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle* 2020, 19 (3), 363-375.

¹⁵Singh, V.; Khalil, M. I.; De Benedetti, A., The TLK1/Nek1 axis contributes to mitochondrial integrity and apoptosis prevention via phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle* 2020, 19 (3), 363-375.

¹⁶Stracker, T., Petrini, J. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 90–103 (2011).

¹⁷Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development.

Science. 2008 Mar 7;319(5868):1352-5. doi: 10.1126/science.1140735.

¹⁸Zhu, J.; Cai, Y.; Liu, P.; Zhao, W., Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 476 (4), 522-527.

¹⁹Reinhardt, Luiza Steffens; Morás, Ana Moira; Henn, Jeferson Gustavo; Arantes, Pablo Ricardo; Ferro, Matheus Bernardes; Braganhol, Elizandra; De Souza, Priscila Oliveir ; De Oliveira Merib, Josias; Borges, Gabriela Ramos; Dalanhol, Carolina Silveira; De Barros Dias, Mabilly Cox Holanda; Nugent, Michael; Moura, Dinara Jaqueline. Nek1-inhibitor and temozolomide-loaded microfibers as a co-therapy strategy for glioblastoma treatment. *International Journal Of Pharmaceutics*, v. 617, p. 121584, 2022.

²⁰Coene KLM, Mans DA, Boldt K, Gloeckner CJ, van Reeuwijk J, Bolat E, et al. The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Sep [cited 2022 Aug 23];20(18):3592–605. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685204/>

²¹Doles J, Hemann MT. Nek4 status differentially alters sensitivity to distinct microtubule poisons. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2022 Aug 23];70(3):1033–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20103636/>

²²Huo T, Canepa R, Sura A, Modave F, Gong Y. Colorectal cancer stages transcriptome analysis. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 Aug 23];12(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29182684/>

²³Ding NH, Zhang L, Xiao Z, Rong ZX, Li Z, He J, et al. NEK4 kinase regulates EMT to promote lung cancer metastasis. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Aug 23];22(12):5877–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30247800/>

²⁴Westphal, M.; Lamszus, K., The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 2011, 12 (9), 495-508.

²⁵Morás AM, Henn JG, Steffens Reinhardt L, Lenz G, Moura DJ. Recent developments in drug delivery strategies for targeting DNA damage response in glioblastoma. *Life Sci*. 2021 Nov 11;287:120128. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120128

²⁶Wakaskar, R. R. (2018). Promising effects of nanomedicine in cancer drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 26(4), 319–324. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1377207>

²⁷Wang, F., Li, C., Cheng, J., & Yuan, Z. (2016). Recent advances on inorganic nanoparticle-based cancer therapeutic agents. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 13, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph13121182>

²⁸Steffens, L.; Morás, A. M.; Arantes, P. R.; Masterson, K.; Cao, Z.; Nugent, M.; Moura, D. J., Electrospun PVA- Dacarbazine nanofibers as a novel nano brain-implant for treatment of glioblastoma: in silico and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020, 143, 105183.

²⁹Dawoud M, Abdou R. 2022. Ion exchange column technique as a novel method for evaluating the release of docetaxel from different lipid nanoparticles. *Drug Deliv Transl Res.* 12(1):282–293.

³⁰Dawoud MZ, Nasr M. 2016. Comparison of drug release from liquid crystalline monoolein dispersions and solid lipid nanoparticles using a flow cytometric technique. *Acta Pharm Sin B.* 6(2): 163–169.

³¹Wörle G, Drechsler M, Koch MHJ, Siekmann B, Westesen K, Bunjes H. 2007. Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions. *Int J Pharm.* 329(1–2):150–157.

³²Moraes, E. C.; Meirelles, G. V.; Honorato, R. V.; de Souza Tde, A.; de Souza, E. E.; Murakami, M. T.; de Oliveira, P. S.; Kobarg, J., Kinase inhibitor profile for human nek1, nek6, and nek7 and analysis of the structural basis for inhibitor specificity. *Molecules* 2015, 20 (1), 1176-91.

³³Elsocht, M.; Giron, P.; Maes, L.; Versées, W.; Gutierrez, G.J.; De Grève, J.; Ballet, S. Structure–Activity Relationship (SAR) Study of Spautin-1 to Entail the Discovery of Novel NEK4 Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 635. <https://doi.org/10.3390/ijms22020635>

³⁴Jeferson Gustavo Henn, Tanira Alessandra Silveira Aguirre, Michael Nugent, Dinara Jaqueline Moura, Cancer nanomedicine: Recent developments in drug delivery systems and strategies to overcome eventual barriers to achieve a better outcome, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 91, 2024, 105254, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105254>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DA FARINHA DE FOLHA DE OLIVEIRA (*Olea europaea* LINNAEUS) EM MODELO ANIMAL E REVISÃO DA EFICÁCIA
CARDIOPROTETORA DA OLEUROPEÍNA**

Me. Rafaella Câmara Rocha Menezes

Projeto de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Dallegrave

Co-orientadores: Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Profa. Dra. Simone Morelo Dal Bosco

Porto Alegre

2021

RESUMO

A obesidade e o sobrepeso são fatores de risco para doenças cardiovasculares e possuem alta prevalência na população mundial. O uso de componentes isolados provenientes de plantas tem sido estudado para auxílio na perda de peso e melhora da condição cardiovascular. Um desses produtos são as folhas de oliveira, que são ricas em oleuropeína. As folhas de oliveira são um subproduto proveniente da produção de olivas. Sendo assim, este tipo de cultivo envolve uma necessidade de reutilização ou emprego deste resíduo em outros processos produtivos. Esta tese está dividida em três etapas, sendo elas: etapa 1 – ensaio de toxicidade crônica com ratos machos e fêmeas por 90 dias (OECD 408), etapa 2 – revisão sistemática sobre os efeitos da oleuropeína associados à cardioproteção em seres humanos e, por fim, etapa 3 – desenvolvimento de linha de produtos de gênero alimentício a base de farinha de folha de oliveira. Os resultados esperados da etapa 1 envolvem a produção de dois artigos contendo dados referente a hematologia, bioquímica, histologia, parâmetros de estresse oxidativo e imunológicos. Já na etapa 2, o resultado esperado está relacionado a um artigo de revisão sistemática com dados relacionados ao consumo de oleuropeína e saúde cardiovascular em seres humanos. A etapa 3 terá como produto um artigo com dados referentes à análise físico-química e análise sensorial (análise descritivo-quantitativa). Os produtos obtidos da tese de doutorado servirão como base em três pilares, avaliação da segurança, revisão da eficácia protetora cardiovascular e desenvolvimento de produtos alimentícios.

Palavras-chaves: folha de oliveira; oleuropeína; ensaio toxicológico; revisão sistemática; desenvolvimento de produtos.

ABSTRACT

Obesity and overweight are risk factors for cardiovascular diseases and have a high prevalence in the world population. The use of isolated components from plants has been studied to aid in weight loss and improve cardiovascular condition. One such product is olive leaves, which are rich in oleuropein. Olive leaves are a by-product from the production of olives. Therefore, this type of cultivation involves a need to reuse or use this residue in other production processes. This thesis is divided into three stages, which are: stage 1 - chronic toxicity test with male and female rats for 90 days (OECD 408), stage 2 - systematic review on the effects of oleuropein associated with cardioprotection in humans and, for finally, stage 3 - development of a line of food products based on olive leaf flour. The results expected from step 1 involve the production of two articles containing data on hematology, biochemistry, histology, oxidative stress, and immunological parameters. In step 2, the expected result is related to a systematic review article with data related to the consumption of oleuropein and cardiovascular health in humans. Step 3 will produce an article with data referring to physical-chemical analysis and sensory analysis (descriptive-quantitative analysis). The products obtained from the doctoral thesis will serve as a basis on three pillars, safety evaluation, review of cardiovascular protective efficacy and development of food products.

Keywords: olive leaf; oleuropein; toxicological assay; systematic review; product development.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* Linnaeus) é uma espécie vegetativa de presença milenar na vida dos seres humanos. O seu cultivo tem sido realizado desde tempos remotos. O seu fruto, a oliva ou azeitona, possui uma importante utilização na culinária, principalmente na região do Mediterrâneo (Lavee, 1996). A partir da colheita de azeitona é realizada a produção do azeite de oliva, também com implicações na culinária, mas sobretudo como aliado na saúde de populações, principalmente europeias.

A partir da produção de oliva para extração do azeite de oliva extra-virgem, substratos são gerados, necessitando um descarte adequado ou aproveitamento para gerar novos produtos. Um destes substratos são as “folhas de oliveira”, mistura entre folhas e galhos que possuem um potencial

antioxidante relacionada aos polifenóis presentes (Montedoro, 1993). Os principais compostos identificados nas folhas são a oleuropeína e o hidroxitirosol (Benavente-García, 2000).

A oleuropeína é o composto que confere o sabor amargo e odor característico das azeitonas, possuindo estabilidade e estando presente tanto no azeite, nos frutos e mais abundantemente, nas folhas (Servili, 1999). Diversos estudos têm mostrado um potencial benéfico a partir do consumo deste antioxidante natural, sendo preferível a fórmulas sintéticas (Salah, 2017). São descritos na literatura uma larga possibilidade de efeitos protetores à saúde humana a partir do consumo de oleuropeína, dentre eles antiarrítmico, imunoestimulante, cardioprotetor, hipotensor, anti-inflamatório, antioxidante e antitrombótico (Hassen, 2015; El SN, 2009).

A prevalência de sobrepeso e obesidade no mundo, segundo dados da OMS (2016), são de 39% e de 13%, respectivamente. Sobrepeso e obesidade são fatores de risco para uma série de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, que lideram o ranking das causas de morte no mundo. As formas de controle de condições multifatoriais como sobrepeso e obesidade são preventivas e reversíveis, muitas vezes associadas ao padrão alimentar e à prática de exercícios físicos, envolvendo também outros aspectos da qualidade de vida (OMS, 2020).

Dos efeitos estudados da oleuropeína, o efeito cardioprotetor relacionado ao consumo é um dos mais explorados (Andreadou, 2015; Omar, 2010). Pesquisas com experimentação animal tanto utilizando a oleuropeína isolada, quanto o extrato de folha de oliveira, tem mostrado resultados benéficos quanto a diminuição do ganho de peso corporal, diminuição do colesterol total e do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), diminuição da pressão arterial, da frequência cardíaca e até de efeito cardiotoxícos induzidos por outras drogas. (Romero, 2016; Olmez, 2015; Hadrich, 2016; Çomez, 2020).

Entretanto, lacunas sobre o real efeito pertencente ao antioxidante oleuropeína na folha de oliveira quando processada e armazenada deixa questionamentos. A presença do alto teor de fibras e proteínas associadas à folha de oliveira promove um debate acerca de qual componente promove tais benefícios, ou se resulta da junção de todos os fatores (Menezes, 2019). O consumo de fibras solúveis e de dietas com alto teor de proteína tendem a reduzir a capacidade de consumo do valor energético total, o que também pode levar a uma redução do ganho de peso (McRae, 2020; Kahleova, 2018; Westerterp-Plantenga, 2012). Tendo isto posto, se faz necessário aprofundar as investigações a fim de esclarecer a possibilidade na redução do ganho de peso e os efeitos consequentes disso.

Ademais, a pesquisa prévia de Menezes (2019) avaliou a toxicidade subcrônica da farinha de folha de oliveira por 28 dias em ratas Wistar (500mg/kg; 1000mg/kg; 2500mg/kg) não havendo sinais de toxicidade. No entanto, uma lacuna relacionada à redução do ganho de peso dos animais no período estudado sugere que uma avaliação por tempo mais longo se faz necessária. Tendo isso em vista, essa pesquisa visa preencher os questionamentos levantados e validar a segurança relacionada ao consumo da farinha de folha de oliveira.

2 JUSTIFICATIVA

A farinha da folha de oliveira ainda é pouco explorada no mercado quando comparada aos seus potenciais efeitos na promoção da saúde. Além disso, a produção de olivas e o descarte sobressalente das folhas resultante das podas levantam uma questão a respeito da sustentabilidade desse cultivo. Ademais, os latentes efeitos da folha de oliveira quanto às funções antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno e cardioprotetor são alguns dos benefícios que vem sendo estudados. Tendo em vista o aumento no número de publicações, um avanço no modelo estudado sugere que uma revisão com humanos seja realizada a fim de elucidar a possível cardioproteção associada ao seu consumo. Essa pesquisa visa também preencher os questionamentos levantados quanto a toxicidade crônica em ratos fêmeas e machos e validar a segurança relacionada ao consumo da farinha de folha de oliveira. Por fim, promover a elaboração de uma linha de produtos alimentícios utilizando a farinha de folha de oliveira para certificar a usabilidade deste insumo.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é avaliar a segurança da farinha de folhas de oliveira em modelo animal, revisar a eficácia cardioprotetora do seu principal constituinte a oleuropeína em humanos e desenvolver

produtos alimentícios utilizando farinha de folhas de oliveira. Sendo o estudo subdividido em 3 etapas independentes.

3.1 Objetivo Geral da Etapa 1

O objetivo geral é avaliar a toxicidade oral crônica durante 90 dias da farinha de folha de oliveira em ratos Wistar adultos machos e fêmeas.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Estimar a dose crônica sem efeitos adversos observados (NOAEL);
- Avaliar a ingestão hídrica e alimentar durante o ensaio;
- Avaliar os parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), plaquetas e leucócitos) em plasma e contagem diferencial em sangue total corado em lâmina, e bioquímicos (ureia, creatinina, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina, amilase, creatinina, creatinínase fração MB, lipase, glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol LDL e colesterol HDL) em soro.
- Avaliar parâmetros de produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-6 (interleucina 6) e IL-1 (interleucina 1) em soro e diferentes tecidos (hepático e cardíaco);
- Avaliar o efeito dos biomarcadores de estresse oxidativo: TBARS, Óxido nítrico (NO) e Espécies reativas de oxigênio (ROS).
- Avaliar a histopatologia dos órgãos (coração, fígado e rins).

3.2 Objetivo Geral da Etapa 2

O objetivo geral desta etapa é realizar uma revisão sistemática sobre a oleuropeína e seus possíveis efeitos cardioprotetores em seres humanos.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Registrar o protocolo da revisão no PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*).
- Elaborar um banco de dados a partir da busca realizada;
- Selecionar os artigos que se enquadram no desenho da revisão proposta;
- Coletar os dados das pesquisas aprovadas na Fase 1, incluindo: dosagem e origem da oleuropeína; características amostrais; resultados obtidos, entre outros;
- Avaliar a qualidade metodológica e o risco de viés dos artigos através das ferramentas previamente selecionadas;
- Compilar a tabela com os dados extraídos.

3.3 Objetivo Geral da Etapa 3

- O objetivo desta etapa é criar uma linha de produtos de gênero alimentício com adição da farinha de folha de oliveira (*Olea europea* Linnaeus).

3.3.1 Objetivos Específicos da Etapa 3

- Elaborar dez formulações de produtos com base na farinha da folha de oliveira (*Olea europea* Linnaeus)
- Analisar físico-quimicamente os produtos obtidos a partir da adição da farinha da folha de oliveira (*Olea europea* Linnaeus)
- Analisar sensorialmente o produto obtido a partir da farinha da folha de oliveira (*Olea europea* Linnaeus)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

Para realização dos experimentos das etapas 1 e 3, as folhas serão coletadas, processadas, analisadas e armazenadas para que haja uniformidade na linha de base. As folhas de oliveira deste

estudo serão de produção orgânica, fornecidas pela Fazenda Experimental, localizada no município de Barra do Ribeiro-RS, Brasil. (Latitude: -30.2915, Longitude: -51.3026 30° 17' 29" Sul, 51° 18' 9" Oeste).

Para a obtenção da farinha de folha de oliveira, inicialmente as folhas serão colhidas, selecionadas, separadas do caule e pesadas. Para lavagem, as folhas serão imersas em água deionizada durante 15 minutos, por duas vezes. Após esse processo, as folhas serão submersas em uma solução com hipoclorito de sódio a 1% para a higienização e enxaguadas em água corrente durante 30 minutos. Depois serão lavadas novamente com água deionizada durante 15 minutos, por duas vezes. As folhas lavadas serão secas em superfície de aço inoxidável a uma temperatura média de 37 °C por 48 horas. Com as folhas secas, estas serão submetidas à moagem utilizando um equipamento que desempenha diversas funcionalidades, entre elas a moagem, o Thermomix Vorwerk® (Wuppertal, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha). Este será utilizado na temperatura de 37 °C até a obtenção da farinha. Após o processo de moagem, o produto será peneirado em peneira de aço inoxidável manual (250 µm) com a peneira granulométrica Inox 8X2 abertura 0,5 mm malha 35 (São Paulo, São Paulo, Brasil). A farinha será armazenada em recipiente de vidro com tampa devidamente fechada até o momento da utilização.

ETAPA 1

4.2 Local de realização do projeto

Os ensaios de toxicidade *in vivo* serão realizados nas salas de Experimentação do Biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), bem como no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia da UFCSPA. As análises hematológicas e bioquímicas serão realizadas no Laboratório de Análises Clínicas, os marcadores imunológicos e de estresse oxidativo no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular e a histopatologia no Laboratório de Patologia, todos localizados na UFCSPA.

4.3 Ensaio de Toxicidade Crônica (OECD 408)

Serão utilizados 100 ratos Wistar (50 ratos machos e 50 ratas fêmeas), de 60 dias de idade, oriundas do Biotério da UFCSPA.

Será realizado jejum prévio de 3 horas antes da administração da substância teste (das 8 às 11 horas). O teste é baseado no método de toxicidade em dose repetida de 90 dias de acordo com *Organization for Economic Cooperation & Development* (OECD 408), onde grupos de 10 animais de cada sexo serão tratados por via oral (pellet) durante 90 dias. Os grupos serão divididos em doses de 500mg/kg, 750mg/kg e 1000mg/kg de folha de oliveira, além de um grupo controle não tratado e um grupo controle positivo (fibra solúvel 6%). A dose do controle positivo será calculada baseada no volume total da maior dose administrada nos grupos tratados. No momento da realização do ensaio, será realizada a pesagem diária da quantidade de ração consumida nas últimas 24 horas e do volume de água ingerido por caixa, para posterior síntese de dados sobre ingestão hídrica e alimentar dos animais. Os animais ficarão dispostos em caixas plásticas organizadoras de 56 litros, organizados em canos individualizados com circulação de ar, segmentados a partir dos seus grupos. Os animais ficam retidos nas caixas até a completa ingestão do pellet e em seguida são colocados de volta nas caixas de polipropileno onde permanecem durante todo o dia.

4.3.1 Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

A eutanásia se dará por sobredosagem de Tiopental Sódico (120mg/kg) e na sequência imediata, o sangue será coletado da veia cava caudal, em um tubo com anticoagulante para análise hematológica, realização de hemograma com distensão sobre lâmina e contagem celular, e através de uma seringa, que ficará em descanso até a retração do coágulo. Posteriormente, o sangue será centrifugado, o soro removido e testado por meio de kits comerciais quanto a concentração sérica de: ureia, creatinina, creatininase MB, transaminases (ALT, AST), fosfatase alcalina e amilase e lipase.

Além disso, o perfil lipídico (LDL, HDL e triglicerídeos) e a glicemia também serão testados através de kits comerciais (em equipamento automatizado - BS 120).

4.3.2 Parâmetros Imunológicos e de Estresse Oxidativo

A produção de citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β será quantificada por ELISA seguindo as recomendações do fabricante (Peprotech, EUA). O óxido nítrico (NO) será aferido através do método de Griess. O método consiste na transformação de nitratos e nitritos por meio da enzima nitrato redutase. Para aferição das espécies reativas de oxigênio (ROS) serão utilizados 30 μ L de amostra de homogeneizado de tecido ou soro. Com análise posterior através da citometria de fluxo. As concentrações de ácido tiobarbitúrico (TBARSs) no plasma serão determinadas através do espectrofluorimetria seguindo o protocolo previamente descrito e expressas como MDA (malondialdeído), nmol/mL (Ohkawa et al., 1979).

4.3.3 Parâmetros Histopatológicos

Após a coleta de sangue, os ratos terão seu abdome incisado e terão seus órgãos removidos (fígado, rins, pulmões, coração e baço). A massa dos órgãos será mensurada e relacionada com a massa corporal de cada indivíduo. Todos os órgãos serão inspecionados quanto a possíveis alterações macroscópicas e o fígado, o coração e os rins serão conservados em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica. Caso haja alteração macroscópica evidente em outros órgãos, estes terão sua avaliação histopatológica efetuada. Após fixação em formol, fatias do fígado, do coração e dos rins serão processadas e os blocos de parafina seccionados em fragmentos de 3 μ m. Os fragmentos serão montados sobre lâmina, corados com hematoxilina/eosina e observados em microscópio óptico a 40, 100 e 400x.

4.4 Análise estatística

Os dados serão apresentados como média e erro padrão da média e a comparação entre os grupos será realizada por análise de variância de uma via ou medidas repetidas para variáveis paramétricas (massa corporal relativa, massa relativa dos órgãos, hematologia e bioquímica sérica) que apresentarem distribuição normal, seguida do pós-teste de Bonferroni e o teste Kruskal Wallis, para as variáveis não paramétricas (escores de lesões histopatológicas) ou para as que não apresentarem distribuição normal, todos considerando uma confiança de 95%. As análises serão realizadas em *software* SPSS versão 19.0.

4.5 Aspectos éticos

O tamanho da amostra respeita o preconizado para o referido ensaio de toxicidade crônica (OECD 408) e todos os procedimentos serão realizados de acordo com legislação vigente no Brasil, Lei 11.794/08, chamada Lei Arouca, regulamentada em 8/10/2008, Portaria 1250/2009 de 07 de outubro de 2009 e com as normas do Código de Ética da Medicina Veterinária, de 2002 (Resolução 722). A pesquisadora responsável pelos ensaios *in vivo* é a Médica Veterinária Eliane Dallegrave, que executará os procedimentos de anestesia, coleta de amostras e eutanásia dos animais. Após eutanásia, as carcaças serão acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e encaminhados para a câmara fria do Biotério da UFCSPA, para posterior encaminhamento à empresa *Ambientuus*.

Quanto aos procedimentos relacionados à execução das técnicas propostas no projeto, serão obedecidos os cuidados pertinentes à adequada manipulação do material utilizado, seringas, agulhas e drogas, constando também, do uso de luvas durante o manuseio dos animais. O material perfuro-cortante será acondicionado em caixas para descarte especial (tipo Descarpac®).

ETAPA 2

A revisão sistemática estará de acordo com os protocolos exigidos pelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) e registrada no PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*).

4.6 Fase 1 – Identificação e seleção

A revisão terá como questão de pesquisa: O uso de oleuropeína possui efeito na saúde cardiovascular em seres humanos?

Os artigos serão buscados nas bases de dados do *Pubmed*, *Scopus* e *Web of Science*. Os descritores selecionados estão de acordo com a maior utilização nos artigos e validados através das buscas preliminares, sendo ambos *MESH terms*.

Os critérios de elegibilidade foram definidos baseados na questão PICOT. Tendo como população alvo (P), adultos, homens ou mulheres, de idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos, com doenças cardiovasculares prévias. A intervenção (I) será baseada no consumo do composto isolado de oleuropeína ou do extrato de folha de oliveira, independentemente da via de administração utilizada. O grupo controle (C) foi definido como o tratamento padrão ouro. E os desfechos (O) que serão avaliados estão relacionados a melhoras nos quadros de doenças do sistema cardíaco, sendo primariamente ligados a: hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, hipertensão renal, diabetes, arritmia cardíaca e cardiotoxicidade – podendo ser adicionados outros desfechos. Os tipos de estudo (T) serão ensaios clínicos randomizados. Todos os critérios de elegibilidade serão validados na busca preliminar conforme os resultados.

4.6.1 - Busca preliminar

A busca realizada em todos os bancos teve como descritores padronizados: oleuropein; olive leaf; olive leaves; cardiovascular disease e cardiovascular diseases.

Pubmed (**n=60**) – (oleuropein OR "olive leaf" OR "olive leaves") AND ("cardiovascular disease" OR "cardiovascular diseases")

Scopus (**n=1228**) - ALL (oleuropein OR "olive leaf" OR "olive leaves") AND ALL ("cardiovascular disease" OR "cardiovascular diseases") com filtro "artigos" aplicado.

Web of Science (**n=131**) - TS = ((oleuropein OR "olive leaf" OR "olive leaves") AND ("cardiovascular disease" OR "cardiovascular diseases"))

4.7 Fase 2 – Extração dos dados

Após a triagem por pares e desempate por um terceiro revisor e leitura na íntegra dos artigos, será construído o banco dados com a seleção final. Após, informações relevantes sobre os estudos serão extraídas para síntese qualitativa. As informações recolhidas dos artigos serão: país de origem e ano; tipo de intervenção e dosagem; características amostrais; desfecho avaliado; resultados; e outros itens que se apresentarem relevantes.

4.8 Fase 3 – Aplicação das ferramentas

Para a avaliação do risco de viés, as ferramentas utilizadas serão Rob 2.0. A ferramenta Rob 2.0 será utilizada em estudos clínicos randomizados baseada em alguns pontos-alvo como: risco de viés decorrente do processo de randomização; risco de parcialidade devido a desvios das intervenções pretendidas (efeito da atribuição da intervenção); dados de resultados perdidos; risco de viés na medição do resultado; risco de viés na seleção do resultado relatado; e outros riscos de viés (Sterne et al. 2019).

Para a avaliação da qualidade dos estudos será utilizada a GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluations). A partir da ferramenta serão avaliados os resultados clinicamente relevantes para que a qualidade seja julgada como alta, moderada, baixa ou muito baixa (Guyatt et al. 2008).

ETAPA 3

4.9 Elaboração da formulação

A elaboração dos produtos será realizada no laboratório de Técnica e Dietética, do curso de Nutrição da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Através de uma série de formulações teste pré-elaboradas, serão realizados testes preliminares para adequar a proporção dos ingredientes visando uma boa textura e sabor para o produto.

Todas as amostras de cada produto irão conter os mesmos ingredientes. A preparação pode sofrer mudanças de acordo com a necessidade de incrementar sabores e texturas.

Serão elaboradas cinco formulações (A, B, C, D e E) distintas para cada produto, com concentrações de 3%, 5% e 7%, 9% e 11% de folhas de oliveira, respectivamente. Em cada uma das preparações irá ser retirada parte do ingrediente majoritário, mantendo a quantidade, em gramas, total. Além disso, haverá também o grupo F, que será controle, não havendo adição de farinha e de folha de oliveira.

Para a elaboração dos produtos, primeiramente, serão pesados todos os ingredientes em balança eletrônica digital. Após a pesagem, serão elaborados conforme a técnica culinária correspondente. Após esse processo, serão armazenados em temperatura ambiente em pote vedado até o uso pelos painelistas.

4.10 Análise físico-química

Serão utilizados os seguintes procedimentos para determinação das características físico-químicas: cinzas por incineração a 550 °C, umidade em estufa a 105 °C até peso constante, lipídios pelo método de extração por solvente (método de Soxhlet), e proteína pela determinação do teor de nitrogênio total pelo Método de Kjeldahl e conversão em proteína bruta pelo fator 6,25 (Pregnotatto, 1985).

O teor de carboidratos totais será determinado através da diferença entre 100g de amostra e a somatória dos valores encontrados para os componentes citados anteriormente. Por meio da soma dos resultados de multiplicação das porcentagens de carboidratos, proteínas e lipídios pelos seus respectivos fatores de conversão de Atwater (4, 4 e 9 kcal/g) foi determinado o valor energético.

As análises serão realizadas em triplicata e os reagentes utilizados serão de grau analítico. A determinação de atividade antioxidante será feita através da captura do radical ABTS e DPPH, e a oleuropeína por cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC). As análises serão realizadas na Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

4.11 Análise Descritivo-Quantitativa

Para a avaliação da linha de produtos gerada será utilizada a metodologia de Análise Descritivo Quantitativa (ADQ), que permite a obtenção de dados descrevendo as características sensoriais do produto. A aplicação do teste de ADQ será realizada com 12 painelistas previamente treinados. O teste será aplicado no laboratório de análise sensorial da própria universidade. Não serão aceitos aqueles que apresentem alguma afecção bucal, deficiência física que impossibilite as avaliações necessárias ou que possuam alergia e/ou intolerância a algum dos ingredientes da formulação do produto.

A análise será realizada em cabines individuais sob luz branca e à temperatura ambiente, com as amostras dispostas em pratos descartáveis brancos. As amostras, em porções padronizadas (aproximadamente 5g), serão codificadas com números aleatórios de três dígitos e apresentadas aos provadores de forma aleatória. Junto com as amostras, será entregue água mineral à temperatura ambiente para limpeza das papilas gustativas.

Todos os participantes precisarão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, seguindo a Resolução 466/12 do CNS/MS.

4.12 Análise estatística

O delineamento experimental será o de blocos casualizados, e os dados obtidos na análise físico-química e sensorial das formulações serão analisadas através de Análise de Variância (ANOVA). Para a comparação das médias entre as amostras, será utilizado o teste de Bonferroni, ao nível de 5% de significância. Para a análise dos dados será utilizado o software SPSS versão 19.0.

5 Resultados esperados e produtos

São resultados esperados da Etapa 1 que a farinha de folha de oliveira não se apresente como uma matéria tóxica para os ratos fêmeas e machos durante o experimento. Serão produtos obtidos desta etapa a produção de dois artigos, um contendo dados quanto a hematologia, bioquímica, e histopatologia, e outro de imunologia e de estresse oxidativo. Os dados podem ser publicados em revistas internacionais como *Food and Chemical Toxicology* (Fator de impacto 4.6) e *Toxicology* (Fator de impacto 4.09).

Já o produto da Etapa 2 é uma revisão sistemática de alta qualidade, com ferramentas validadas e um olhar crítico dos autores. O resultado esperado é uma associação possivelmente positiva entre o consumo de oleuropeína e a melhora da saúde cardiovascular. A revista prevista para publicação do artigo é a *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* de fator de impacto 7.86.

Os produtos da Etapa 3 incluem a produção de um artigo publicado em revista internacional, contendo uma larga quantidade de dados relacionados aos resultados desta etapa. É esperado que os produtos elaborados com farinha de folha de oliveira possuam uma análise sensorial favorável em relação a aceitação global. Além disso, um perfil nutricional equilibrado entre os macronutrientes também será desejado. Uma revista alvo deste artigo será a *Food Research International* (4.97) e a *LWT – Food Science and Technology* (4.006).

5 CRONOGRAMA

Etapa – Atividade	Semestre 2021/2-2025/1							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Etapa 0 - Coleta de matéria-prima								
Etapa 0 - Processamento de matéria-prima								
Etapa 0 - Análise físico-química de matéria-prima								
Etapa 01 - Submissão ao CEUA								
Etapa 01 - Solicitação de animais								
Etapa 01 - Aquisição dos materiais								
Etapa 01 - Protocolo experimental								
Etapa 01 - Avaliação hematológica e bioquímica								
Etapa 01 – Avaliação Estresse Oxidativo e Imunológico								
Etapa 01 – Análise histológica								
Etapa 01 - Análises estatísticas dos resultados								
Etapa 01 - Apresentação de resultados em eventos científicos								
Etapa 01 - Elaboração do artigo científico								
Etapa 02 - Identificação e seleção								
Etapa 02 - Extração de dados								
Etapa 02 - Aplicação de ferramentas								
Etapa 02 - Elaboração do artigo científico								
Etapa 02 - Submissão do artigo								
Qualificação da tese								
Etapa 03 - Submissão ao CEP								
Etapa 03 - Aquisição de Insumos								
Etapa 03 – Experimentação e elaboração produtos								
Etapa 03 – Recrutamento e análise sensorial								
Etapa 03 - Elaboração de artigo científico								
Etapa 03 - Submissão do artigo								
Elaboração e apresentação da tese								

* Ensaio in vivo: 22/2-24/1

6 ORÇAMENTO

Material	Quantidade	Preço unitário (R\$)	Total (R\$)
Kit análise bioquímica – CK MB	1 unidade	165,00	165,00
Kit análise bioquímica – Creatinina	1 unidade	48,00	48,00
Kit análise bioquímica - AST	1 unidade	83,00	83,00
Kit análise bioquímica - ALT	1 unidade	83,00	83,00
Kit análise bioquímica – Uréia	1 unidade	135,00	135,00
Kit análise bioquímica – Fosfatase alcalina	1 unidade	160,00	160,00
Kit análise bioquímica – Amilase	1 unidade	180,00	180,00
Kit análise bioquímica - Lipase	1 unidade	210,00	210,00
Kit análise bioquímica – HDL	1 unidade	150,00	150,00
Kit análise bioquímica - Triglicerídeos	1 unidade	135,00	135,00
Kit análise bioquímica - LDL	1 unidade	150,00	150,00
Kit análise bioquímica - Glicose	1 unidade	120,00	120,00
Reagentes para estresse oxidativo (TBARS, TIOIS, NO, ROS)	4 kits	390,0 (dólar)	8377,00
Kits de Elisa e reagentes para ELISA (IL-6, TNF- α , IL-1)	3 kits	320,0 (dólar)	5436,00
Lâminas 26x76 para microscopia	2 caixas	5,00	10,00
Laminulas 22x22 para microscopia	2 caixas	3,00	6,00
Tubos de coleta de sangue com EDTA	100 unidades	0,70	70,00
Tubos de coleta de sangue com ativador de coágulo	100 unidades	1,21	121,89
Seringas com agulha - 3mL	1 caixa	24,00	24,00
Luvras para procedimento	1 caixa	50,00	50,00
Reagentes para análise físico-química	-	-	5000,00
Materiais de consumo e vidraçarias	-	-	3000,00
Transporte para coleta de matéria-prima	2 unidades	100,00	200,00
Insumos para produto		500,00	500,00
Total (R\$)			24.413,00

Fonte financiadora:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA): Recursos financeiros próprios do pesquisador, verba PROAP, bem como vários dos insumos já estão disponíveis no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia.

REFERÊNCIAS

- ANDREADOU, Ioanna et al. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 69, p. 4-16, 2014.
- ANDREADOU, Ioanna et al. The natural olive constituent oleuropein induces nutritional cardioprotection in normal and cholesterol-fed rabbits: comparison with preconditioning. **Planta Medica**, v. 81, n. 08, p. 655-663, 2015.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2013.
- EL, Sedef N.; KARAKAYA, Sibel. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition reviews**, v. 67, n. 11, p. 632-638, 2009.
- GUYATT, Gordon H. et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. **Bmj**, v. 336, n. 7650, p. 924-926, 2008.
- HADRICH, Fatma et al. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. **Chemico-biological interactions**, v. 252, p. 54-60, 2016.
- HASSEN, Imed; CASABIANCA, Hervé; HOSNI, Karim. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 926-940, 2015.
- KAHLEOVA, Hana et al. A plant-based high-carbohydrate, low-fat diet in overweight individuals in a 16-week randomized clinical trial: the role of carbohydrates. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1302, 2018.
- LAVEE, S. World olive encyclopedia. **International Olive Oil Council**, v. 1, p. 61-106, 1996.
- MCRAE, Marc P. Effectiveness of Fiber Supplementation for Constipation, Weight Loss, and Supporting Gastrointestinal Function: A Narrative Review of Meta-Analyses. **Journal of Chiropractic Medicine**, 2020.
- MENEZES, R. Desenvolvimento de produtos e segurança alimentar: folhas de oliveira (*olea europaea* L). Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, p.110. 2019.
- OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OLMEZ, Ercument et al. Olive leaf extract improves the atherogenic lipid profile in rats Fed a high cholesterol diet. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 10, p. 1652-1657, 2015.
- OMAR, Syed Haris. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 3, p. 111-121, 2010.
- ROMERO, M. et al. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. **Food & function**, v. 7, n. 1, p. 584-593, 2016.
- SALAH, M. Ben; HAFEDH, A.; MANEF, A. Anti-diabetic activity and oxidative stress improvement of Tunisian Gerboui olive leaves extract on alloxan induced diabetic rats. **J. Mater**, v. 8, p. 1359-1364, 2017.
- SERVILI, Maurizio et al. Phenolic compounds of olive fruit: one-and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 12-18, 1999.

STERNE, Jonathan AC et al. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. **bmj**, v. 366, 2019.

WESTERTERP-PLANTENGA, Margriet S.; LEMMENS, Sofie G.; WESTERTERP, Klaas R. Dietary protein—its role in satiety, energetics, weight loss and health. **British journal of nutrition**, v. 108, n. S2, p. S105-S112, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global health observatory. 1999.

ÇÖMEZ, Mehmet Selim et al. Protective effect of oleuropein on ketamine-induced cardiotoxicity in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 393, p. 1691-1699, 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DE GLIFOSATO EM DIETAS ENTERAIS E FÓRMULAS INFANTIS À BASE
DE SOJA**

Me. Kathleen Krüger Peres

Projeto de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Dallegrave

Porto Alegre
2023

RESUMO

O glifosato é um herbicida sistêmico, de amplo espectro e pós-emergente. O aumento do uso de glifosato ao longo dos anos também trouxe uma preocupação crescente sobre sua possível toxicidade e consequências para a saúde humana, por essa razão o objetivo desse estudo será avaliar a concentração de glifosato nas fórmulas enterais e infantis à base de soja. Este estudo está dividido em 2 etapas, sendo elas: etapa 1 - revisão sistemática sobre as recomendações do uso de fórmulas enterais e fórmulas infantis à base de soja; etapa 2 – avaliação da concentração de glifosato em dietas enterais e fórmulas infantis à base de soja pela cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados esperados da etapa 1 envolvem a elaboração de artigo científico de revisão sistemática. Na etapa 2 a produção de artigo científico contendo informações capazes de estimar a exposição ao glifosato a partir da concentração encontrada nas fórmulas enterais e infantis e relacionar com dados da ingestão diária aceitável, determinada pela ANVISA. Os produtos obtidos da tese de doutorado servirão como base em duas vertentes: revisão da legislação relacionada ao consumo adequado e avaliação de conformidade de concentração de glifosato em produtos alimentícios para dietas especiais.

Palavras-chaves: Agrotóxicos, Glifosato, Soja, Nutrição Enteral, Suporte Nutricional.

ABSTRACT

Glyphosate is a systemic, broad-spectrum, post-emergent herbicide. The increased use of glyphosate over the years has also brought a growing concern about its possible toxicity and consequences for human health, for this reason the objective of this study will be to evaluate the concentration of glyphosate in soy-based enteral and infant formulas. This study is divided into two stages, namely: stage 1 - systematic review on the recommendations for the use of enteral formulas and infant formulas based on soy; step 2 – evaluation of glyphosate concentration in enteral diets and soy-based infant formulas by high performance liquid chromatography. The expected results of step 1 involve carrying out a systematic review scientific article. In step 2, the production of a scientific article containing information capable of simulating exposure to glyphosate based on the concentration found in enteral and infant formulas and relating it to acceptable daily intake data, determined by ANVISA. The products obtained from the doctoral thesis will serve as a basis in two areas: review of legislation related to adequate consumption and assessment of conformity of glyphosate concentration in food products for special diets.

Keywords: Pesticides, Glyphosate, Soybean, Enteral Nutrition, Nutritional Support, Immunotoxicity, Microbiome

1 INTRODUÇÃO

A denominação “agrotóxicos” refere-se aos praguicidas normalmente utilizados na agricultura, o termo passou a ser utilizado no Brasil com o objetivo de denominar a categoria de venenos agrícolas utilizados e, além disso, evidenciar a toxicidade desses produtos para a saúde e o meio ambiente¹. O uso de agrotóxicos se deu pela dificuldade no plantio de alguns alimentos, como por exemplo a soja, desde as condições climáticas do Brasil quanto também a disseminação de pragas, o que gerou uma necessidade de encontrar produtos que auxiliam no controle desses fatores².

Desses produtos destaca-se o uso do glifosato³, conhecido inicialmente no comércio como *Roundup*®, em 1974, a empresa Monsanto iniciou sua comercialização como herbicida de amplo espectro, posteriormente outros que se seguiram, como *Glyphogan*®, *Touchdown*® ou *Glifloglex*®, os quais são misturas de glifosato e vários adjuvantes usados para aumentar sua penetração nas plantas e aumentar sua atividade⁴. Seu mecanismo de ação é determinado pela inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintase (EPSPS), uma enzima da via do chiquimato, que impede a biossíntese de aminoácidos aromáticos e outros metabólitos secundários em plantas e alguns microrganismos⁵. A EPSPS catalisa a reação entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e o chiquimato 3-fosfato (S3P)⁶, e o glifosato é um inibidor competitivo que bloqueia o sítio de ligação do PEP⁷. Uma vez no ambiente, o glifosato é biotransformado por microrganismos em ácido aminometilfosfônico (AMPA - conhecido como seu metabólito mais ativo) e ácido metilfosfônico (MPA), sendo seus produtos e o próprio glifosato encontrados principalmente nos rins, fígado, intestino delgado e cólon, com posterior eliminação pelas fezes (90%) e urina, em 48 horas. Considerando sua toxicocinética, torna-se relevante conhecer o impacto da sua presença no organismo, mediante diferentes efeitos sobre a saúde³.

A literatura científica revela que o glifosato pode induzir efeitos adversos significativos no sistema reprodutivo dos animais⁸, bem como distúrbios da microbiota intestinal de animais domésticos que vivem perto de áreas agrícolas⁹. Além disso, foram evidenciados os potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos - dependentes da dose, aumento do estresse oxidativo, alteração de funções cerebrais, assim como a suposta correlação com o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, assim como ao sistema imunológico onde há resultados que indicam aumento do estado inflamatório¹⁰.

A soja pode ser consumida de diversas formas, sendo sua maior utilização na produção de derivados industrializados. Os principais alimentos à base de soja são: óleo, extrato hidrossolúvel de soja, tofu, farinha, proteína texturizada de soja e broto de soja. Esses também se fazem presentes em fórmulas de alimentação infantil e nutrição enteral^{11,12}. A soja

tem sido uma ótima opção como fonte proteica para dietas enterais e fórmulas infantis, cuja população possui necessidades nutricionais especializadas que não permitem o uso das formulações tradicionais, onde estão presentes a base proteica de proteína do soro do leite. O uso da soja nessas dietas está associado ao alto valor nutritivo, boa tolerância e baixo custo. No entanto, requer atenção quanto à segurança desses alimentos e as possíveis concentrações de glifosato, pois essas pessoas que as consomem já estão debilitadas em função de doenças pré-existentes ou são populações mais suscetíveis à riscos como a infantil.

Sabendo que o uso do glifosato é aplicado à plantação de soja e que os resíduos desse agrotóxico estão presentes nos grãos e nos alimentos à base de soja, deve-se buscar uma avaliação de tais alimentos e os potenciais riscos desses resíduos encontrados na saúde do consumidor. A RDC Nº295, de 29 de julho de 2019, dispõe a fiscalização e o monitoramento aos procedimentos de avaliação do risco dietético agudo e crônico decorrente da presença de resíduos de agrotóxicos, seus metabólitos e produtos de degradação em alimentos¹³. Além disso, a ANVISA determina o Limite Máximo de Resíduos (LMR), determinado pela quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos oficialmente aceita no alimento.

Tendo em vista a legislação, a determinação de LMR e também a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,04 mg/kg pc¹⁴ o objetivo dessa tese será avaliar a concentração de glifosato nas dietas enterais e fórmulas infantis à base de soja com o propósito de avaliar o consumo diário recomendado e se está de acordo com a IDA.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o público que utiliza dietas enterais à base de soja como fonte alimentar exclusiva ou suplementar para seu aporte nutricional, é importante avaliar a concentração de glifosato nessas formulações, visando avaliar o risco de exposição e o possível acometimento na saúde fragilizada desses indivíduos e consequentemente, seu provável impacto no Sistema Único de Saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral da Etapa 1

O objetivo geral desta etapa é realizar uma revisão sistemática sobre as doses recomendadas e indicações clínicas para o uso de fórmulas enterais e infantis à base de soja em seres humanos.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Registrar o protocolo da revisão no PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*).
- Elaborar um banco de dados a partir da busca realizada;
- Selecionar os artigos que se enquadram no desenho da revisão proposta;
- Coletar os dados das pesquisas para a análise da Etapa 2, incluindo: dosagem e recomendações
- Avaliar a qualidade metodológica e o risco de viés dos artigos através das ferramentas previamente selecionadas;
- Compor a tabela com os dados extraídos.

3.2 Objetivo Geral da Etapa 2

Analisar a concentração de glifosato nas dietas enterais e fórmulas infantis à base de soja de diferentes marcas.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Quantificar a concentração de glifosato presente por ml de fórmula enteral analisada.
- Verificar se a Ingestão Diária Aceitável de Glifosato poderá estar sendo extrapolada pela concentração avaliada nas fórmulas enterais relacionadas ao consumo diário de suporte nutricional dos indivíduos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

Para a realização da Etapa 2 e 3 a amostra será obtida através da obtenção de fórmulas enterais com base proteica à base de soja. Serão obtidas pelo menos 20 formulações (entre fórmulas enterais e infantis) de diferentes lotes relativos a cada uma das marcas (pelo menos 2 de cada tipo de formulação), através da compra pela própria pesquisadora em lojas especializadas e farmácias.

4.2 ETAPA 1

A revisão sistemática estará de acordo com os protocolos exigidos pelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) e registrada no PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*).

4.2.1 Identificação e seleção

A revisão irá se estruturar com base na pergunta de pesquisa estruturada através da análise dos artigos, tendo em vista a indicação e a dosagem do consumo de fórmulas enterais e infantis à base de soja.

Os artigos serão buscados nas bases de dados do Pubmed, Scopus e Web of Science. Os descritores selecionados estão acordo com a maior utilização nos artigos e validados através das buscas preliminares, sendo ambos MESH terms.

4.2.2 Extração dos dados

Após a triagem por pares e desempate por um terceiro revisor e leitura na íntegra dos artigos, será construído o banco de dados com a seleção final. Após, informações relevantes sobre os estudos serão extraídas para síntese qualitativa. As informações recolhidas dos artigos serão: país de origem e ano; indicação de uso e dosagem; características amostrais; desfecho avaliado; resultados; e outros itens que se apresentarem relevantes.

4.2.3 Aplicação das ferramentas

Para a avaliação do risco de viés, as ferramentas utilizadas serão Rob 2.0. A ferramenta Rob 2.0 será utilizada em estudos clínicos randomizados baseada em alguns pontos-alvo como: risco de viés decorrente do processo de randomização; risco de parcialidade devido a desvios das intervenções pretendidas (efeito da atribuição da intervenção); dados de resultados perdidos; risco de viés na medição do resultado; risco de viés na seleção do resultado relatado; e outros riscos de viés (Sterne et al. 2019).

Para a avaliação da qualidade dos estudos será utilizada a GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluations). A partir da ferramenta serão avaliados os resultados clinicamente relevantes para que a qualidade seja julgada como alta, moderada, baixa ou muito baixa (Guyatt et al. 2008).

4.3 ETAPA 2

4.3.1 Amostragem de fórmula enteral

Serão adquiridas 20 fórmulas enterais de 2 marcas e lotes diferentes em sua composição líquida de pack 1L e em pó para as fórmulas infantis (400g).

Para o processo de amostragem, antes da coleta, serão agitadas as embalagens para completa homogeneização. Posteriormente serão retiradas as alíquotas da matéria-prima com auxílio de pipeta de vidro ou dosadores para as alíquotas em pó. Para acondicionar as amostras serão utilizados frascos de plástico estéreis, sempre em triplicata para cada lote de ambas as marcas. Os frascos serão tapados de modo que não haja vazamentos, sendo estes congelados em freezer – 20 °C até a análise. Serão recolhidas as informações para cada

amostra obtida: Nome do produto (com a viabilização de utilizar códigos para cegamento da marca), descrição da fórmula, quantidade (ml), lote, data de fabricação, validade, data e hora da coleta, fornecedor, nome do responsável pela coleta, endereço da coleta.

4.3.2 Determinação de concentração de glifosato

Após o processo de amostragem, as amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), acondicionadas em caixa de gelo, onde serão realizadas as análises de presença e avaliação da concentração de glifosato nas fórmulas através do procedimento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os resultados sobre as amostras serão enviados à pesquisadora para a posterior simulação de exposição, considerando a ingestão diária das formulações enterais.

4.4 Análise estatística

Os dados que apresentarem distribuição normal avaliada pelo teste de Shapiro Wilk serão apresentados como média e erro padrão da média e a comparação entre os grupos será realizada por análise de variância de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. O teste Kruskal Wallis será utilizado para as variáveis não paramétricas ou para as que não apresentarem distribuição normal, todos considerando uma confiança de 95%. As análises serão realizadas em software SPSS versão 19.0.

5 Resultados esperados

Os resultados esperados incluem: na etapa 1 – elaboração de artigo contendo uma revisão sistemática sobre as recomendações do uso de fórmulas enterais e fórmulas infantis à base de soja; na etapa 2: produção de artigo científico contendo a concentração média de glifosato em diferentes formulações enterais a base de soja e a avaliação do risco de exposição, baseado na ingestão máxima recomendada do consumo de glifosato em alimentos, bem como da indicação nutricional dos pacientes com suporte enteral ou suplementar. A submissão dos artigos científicos produzidos terá como alvo as revistas: Food Research International (4.97) ou LWT – Food Science and Technology (4.006).

6 CRONOGRAMA

Etapa – Atividade	Semestres							
	2023	2024	2025	2026				
	1	2	3	4	5	6	7	8
Aquisição dos insumos								
Registro na COMPESQ								
Etapa 01 - Identificação e seleção								
Etapa 01 - Extração de dados								
Etapa 01 - Aplicação de ferramentas								
Etapa 01 - Elaboração do artigo científico								
Etapa 01 - Submissão do artigo								
Qualificação								
Etapa 02 - Amostragem								
Etapa 02 – Preparo das amostras								
Etapa 02 – Análise cromatográfica								
Etapa 02 - Análise dos resultados e avaliação de risco								
Etapa 02 - Elaboração de artigo científico								
Etapa 02 - Submissão do artigo								
Elaboração e Defesa da tese								

7 ORÇAMENTO

Material	Quantidade	Preço unitário (R\$)	Total (R\$)
Fórmula enteral 1	5 unidades (diferentes lotes)	22,99	114,95
Fórmula enteral 2	5 unidades	36,90	184,50
Fórmula infantil 1	5 unidades	86,99	434,95
Fórmula infantil 2	5 unidades	72,49	362,45
Luvras para procedimento	1 caixa	50,00	50,00
Padrões analíticos	-	-	5000,00
Materiais de consumo	-	-	3000,00
Total (R\$)			9.146,85

Fonte financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA): Recursos financeiros próprios do pesquisador, verba PROAP, bem como vários dos insumos já estão disponíveis no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia e nos Laboratórios de Parceiros Externos

REFERÊNCIAS

- 1 - BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Portaria Normativa nº84, de 15 de outubro de 1996. Registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental – (ppa) de agrotóxicos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 out. 1996.
- 2- Peillex C, Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. J Immunotoxicol. 2020 Dec;17(1):163-174. doi: 10.1080/1547691X.2020.1804492.
- 3- Hoef AM, Kok EJ, Bouw E, Kuiper HA, Keijer J (1998). Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. Food Addit Contam 15: 767–774
- 4- Williams G, Kroes R, Munro I (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul Toxicol Pharmacol. 31(2 Pt 1):117–165.

- 5-** Shilo T, Zygier L, Rubin B, Wolf S, Eizenberg H. Mechanism of glyphosate control of *Phelipanche aegyptiaca*. *Planta*. 2016;244:1095–1107
- 6-** Funke T, et al. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 -> Ile and Pro101 -> Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2009;284:9854–9860.
- 7-** Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schönbrunn E. (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc Natl Acad Sci USA*;103:13010–13015.
- 8-** Dallegre E, Mantese FD, Oliveira RT, et al. (2007) Pre - and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 81, 665–673. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0170-5>
- 9-** Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez HM, Krüger M. (2013) The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr Microbiol*. 2013;66:350–358.
- 10-** Peillex C, Pelletier M. (2020) The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity, *Journal of Immunotoxicology*, 17:1, 163-174, DOI: 10.1080/1547691X.2020.1804492
- 11-** Philippi ST. *Nutrição e Técnica Dietética*. 4ª edição. Barueri: Manole; 2019.
- 12-** Barros NEF, Oliveira EMM, Silva OF, Silva JT, Paschoalin VMF. Avaliação qualitativa e quantitativa de soja geneticamente modificada em fórmulas de nutrição enteral. *Rev Nutr*.2010;23(1):37-47. DOI: 10.1590/S1415-52732010000100006
- 13-** ANVISA. Resolução Nº 295 DE 29/07/2019.
- 14-** NOTA TÉCNICA Nº 12/2020/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DOS HERBICIDAS GLIFOSATO E
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, AUDITIVOS, HISTOPATOLÓGICOS E
NEUROQUÍMICOS EM RATOS WISTAR**

Mateus Belmonte Macedo

Projeto de Pesquisa de Doutorado
Orientadora: Dra. Taís Malysz
Coorientadora: Dra. Eliane Dallegrave

**Porto Alegre
2023**

RESUMO

Os herbicidas glifosato e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) são os agrotóxicos mais utilizados mundialmente devido ao seu baixo custo, amplo espectro e eficácia. Apesar dos benefícios, a segurança no uso desses compostos vem sendo questionada e, por esse motivo, diversos estudos buscaram avaliar a toxicidade dessas substâncias em modelos animais e, em menor número, em humanos. Nesse cenário, destaca-se que as pesquisas experimentais existentes majoritariamente utilizam doses altas e vias de exposição que não mimetizam o uso ocupacional e seus efeitos no sistema nervoso maduro. Também são pouco estudados os efeitos dos formulados comerciais, os quais estão disponíveis para compra, sendo a maioria das pesquisas desenvolvidas com a exposição ao ingrediente ativo de forma isolada. Sob essa óptica, a controvérsia dos dados disponíveis na literatura faz com que as agências regulatórias não considerem esses compostos como neurotóxicos, algo que motiva a realização de mais pesquisas para avaliação dos efeitos sobre o sistema nervoso e, em especial, sobre estruturas ainda não estudadas como a cóclea, o aparelho vestibular e a neurofisiologia vocal. Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar a neurotoxicidade inalatória dos formulados comerciais dos herbicidas glifosato e 2,4D através de parâmetros comportamentais, auditivos, histopatológicos e neuroquímicos em ratos Wistar. Para isso, serão utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar, com 60 dias, randomicamente alocados em 4 grupos diferentes com 12 animais: controle, expostos a água (veículo de diluição da formulação); controle positivo para lesão vestibulococlear, tratados com 8mg/kg de cisplatina via intraperitoneal, por 3 dias, 24h antes da eutanásia; glifosato, expostos ao formulado comercial de glifosato Roundup Original® Mais (0,318 mg/L); 2,4D, expostos ao formulado comercial de 2,4D Tecnomyl® (0,014 mg/L). A exposição inalatória será realizada por 4h diárias, 5 vezes por semana, durante 8 semanas, com objetivo de mimetizar o uso ocupacional dessas substâncias. Serão avaliados parâmetros comportamentais, auditivos, vestibulares, vocais, histopatológicos e neuroquímicos. Os dados paramétricos serão comparados entre os grupos por ANOVA de uma via ou de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados não paramétricos serão comparados através do teste Kruskal Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 AGROTÓXICOS	5
1.2 HERBICIDAS	6
1.2.1. GLIFOSATO	7
1.2.1.1 NEUROTOXICIDADE DO GLIFOSATO	9
1.2.2 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)	11
1.2.2.1 NEUROTOXICIDADE DO 2,4-D	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. PROBLEMA DE PESQUISA	16
4. HIPÓTESE	16
5. OBJETIVOS	16
5.1 OBJETIVO GERAL	16
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. MATERIAIS E MÉTODOS	17
6.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO	17
6.2 ANIMAIS	18
6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	19
6.4 ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO	21
6.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	23
6.5.1 TESTE DE CAMPO ABERTO	23
6.5.2 TESTE DE RECONHECIMENTOS DE OBJETOS	23
6.5.3 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	24
6.5.4 TESTE <i>ROTAROD</i>	24
6.6 AVALIAÇÕES AUDITIVAS	25
6.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
6.8 CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO DA PESQUISA	27
6.9 EUTANÁSIA	28
6.10 PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS	28
6.10.1 COLETA DOS ÓRGÃOS	28
6.10.1.1 COLETA DA LARINGE E DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE	28
6.10.1.2 COLETA DO ENCÉFALO	28
6.10.1.3 COLETA DA LÍNGUA	29

6.10.1.4 COLETA DO OSSO TEMPORAL E DO NERVO VESTIBULOCOCLEAR	29
6.10.1.5 COLETA DO SANGUE, ÓRGÃOS ABDOMINOPÉLVICOS E TORÁCICOS	29
6.10.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICOS.....	30
6.10.2.1 TÉCNICA HISTÓLOGICA PADRÃO	30
6.10.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	30
6.10.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	31
6.11 PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS	32
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
8. ASPECTOS ÉTICOS	33
9. CRONOGRAMA	34
10. PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	35
11. ORÇAMENTO.....	35
12. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos podem ser definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias que visam repelir, destruir ou controlar uma praga. Esses compostos estão amplamente presentes em diversos setores da sociedade como na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, em campanhas de saúde pública no combate a vetores, nas indústrias, na medicina veterinária para controle de ectoparasitas e em ambientes domésticos. Os agrotóxicos geralmente são classificados de acordo com a praga-alvo e dentre as principais classes encontram-se os inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas (BRASIL, 2002; FAO, 2022; RICHARDSON *et al.*, 2019).

De acordo com o último relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o uso global de agrotóxicos aumentou durante o período de 2000-2020 em 30%, alcançando 2,7 milhões de toneladas aplicadas em 2020. Nesse cenário, a participação das Américas, o maior contribuinte para elevação dos dados, aumentou de 44% para 51% do total do consumo global de agrotóxicos. Na análise por países, observa-se que os Estados Unidos da América foram o maior usuário de agrotóxicos em 2020, com 0,41 milhão de toneladas (15% do total mundial), o Brasil, na sequência, ocupou o segundo lugar com 0,38 milhão de toneladas (13,9% do total mundial) e, em terceiro lugar, a China com 0,27 milhão de toneladas - 9,8% do total mundial (FAO, 2022).

O uso excessivo e indiscriminado de agrotóxicos representa um sério risco à saúde humana, ao meio ambiente e à qualidade dos alimentos. Nesse cenário, a literatura científica aponta que cerca de 25 milhões de pessoas sofrem envenenamento não intencional por agrotóxicos anualmente em todo o mundo, resultando em duzentas mil mortes e afetando principalmente países de baixa e média renda. Considerando dados nacionais, entre 2010 e 2015, mais de 600 mil casos de intoxicação por agrotóxicos foram registrados, além de 2.074 óbitos. Há de se considerar ainda que os envenenamentos são subnotificados, portanto estima-se que para cada caso registrado haja 50 não registrados (BURALLI *et al.*, 2020).

No panorama ocupacional, os agricultores e os trabalhadores rurais são os mais vulneráveis a intoxicação, principalmente em áreas tropicais que são

mais suscetíveis a proliferação de pragas. Portanto, essa população tende a estar exposta a mais agrotóxicos. Entre os fatores de risco estão a falta de regulamentação de segurança, vigilância e treinamento, baixa conscientização dos efeitos nocivos à saúde, não uso ou utilização incorreta de equipamentos de proteção individual (EPI), manuseio e pulverização inadequados (BURALLI *et al.*, 2020; CURL *et al.*, 2020). No Brasil, soma-se ainda o comércio ilegal de agrotóxicos, possibilitando a compra de compostos controlados ou banidos via contrabando entre os países fronteiriços (DORFMAN; REKOWSKY, 2011).

1.2 HERBICIDAS

Os herbicidas constituem-se como a classe de agrotóxicos mais aplicada mundialmente. Essas substâncias são utilizadas para destruição seletiva de ervas daninhas, inibindo ou interrompendo seu crescimento e desenvolvimento. Embora, sejam utilizados principalmente para fins agrícolas, esses compostos são amplamente aplicados em diversos locais, inclusive domésticos. Os herbicidas podem ser classificados de acordo com a sua especificidade para ervas daninhas, estrutura química, tempo de aplicação e modo de ação. De forma geral, atuam nas vias metabólicas específicas da planta, como fotossíntese, biossíntese de aminoácidos, lipídios e pigmentos, ação de hormônios vegetais ou regulação da divisão celular (COSTAS-FERREIRA; DURÁN; FARO, 2022; CRESTO *et al.*, 2023; GALLO *et al.*, 2023; PEHAR *et al.*, 2023).

É inegável que os alvos moleculares dos agrotóxicos são frequentemente compartilhados entre pragas e espécies não-alvo, incluindo os humanos (RICHARDSON *et al.*, 2019). No panorama ocupacional, o uso desse tipo de produto é extremamente preocupante, visto que muitas vezes a aplicação desses compostos é realizada sem a utilização de equipamentos de proteção individual. Entre os efeitos nocivos dos herbicidas estão: reações alérgicas, irritação cutânea e ocular, alterações neurológicas, respiratórias, hematopoiéticas, hepáticas, nefrológicas, gastrointestinais, pancreáticas e cardiovasculares. A toxicidade pode ser rápida ou lenta, podendo levar de meses a anos para que os sintomas apareçam no trabalhador exposto aos agrotóxicos (PEHAR *et al.*, 2023).

1.2.1. GLIFOSATO

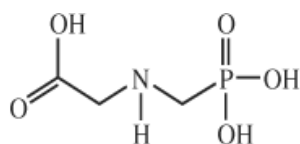
O glifosato é um herbicida de ação sistêmica, não-seletiva, com atividade de amplo espectro e pós-emergente. Pertencente ao grupo químico Glicina Substituída (ANVISA, 2023), sendo o herbicida mais utilizado no mundo e foi sintetizado pela primeira vez em 1950. No entanto, somente em 1970 que a função herbicida dessa molécula foi descoberta por John Franz, um químico da empresa Monsanto® que produziu vários anos depois o primeiro herbicida à base de glifosato, o Roundup®. Atualmente, há centenas de formulações de herbicidas contendo esse ingrediente ativo, sendo comercializados sob diferentes marcas em mais de 100 países em todo o mundo (COSTAS-FERREIRA; DURÁN; FARO, 2022; SOARES *et al.*, 2021).

Em relação à sua estrutura química (Figura - 1), o glifosato é zwitterion com funções fosfonato, carboxilato e amina. A sua configuração zwitteriônica permite quelar com metais trivalentes e quadrivalentes (COUTINHO; MAZO, 2005; SOARES *et al.*, 2021). Nesse contexto, o mecanismo de ação do glifosato está relacionado à sua capacidade de bloquear a via do ácido chiquímico, que está diretamente envolvido na síntese de aminoácidos aromáticos de plantas, fungos e alguns microrganismos. Ao inibir a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase), a qual é a penúltima etapa da via do chiquimato, o glifosato reduz a síntese dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano. Por conseguinte, o bloqueio dessa via leva a redução de proteínas e morte do organismo-alvo em poucos dias (COSTAS-FERREIRA; DURÁN; FARO, 2022). Além do glifosato, os produtos comerciais contêm surfactantes polares, como Polioxietilenoamina (POEA), ácido sulfúrico e ácido fosfórico, os quais promovem o aumento da solubilidade em água e, consequentemente, a penetração e absorção na planta (SOARES *et al.*, 2021).

O glifosato, em sua forma ácida é menos solúvel do que na sua forma de sal. Portanto, os herbicidas à base de glifosato apresentam formulações comerciais na forma de sal. No Brasil, atualmente, quatro tipos desse composto vêm sendo comercializados: Glifosato-isopropilamônio, Glifosato-sal de dimetilamina, Glifosato-sal de potássio e Glifosato-sal de amônio. Dentre todos os formulados comerciais para uso agrícola, a forma de glifosato em sal de isopropilamina é a mais utilizada. Além disso, esse composto também pode estar presente em produtos domissanitários utilizados para jardinagem amadora, na

concentração de uso de ingrediente ativo máxima permitida de 1% - p/v (ANVISA, 2020; SOARES *et al.*, 2021).

Figura - 1: Fórmula estrutural do glifosato



Fonte: COUTINHO E MAZO, 2005.

O uso de formulados à base de glifosato aumentou consideravelmente ao longo dos anos, principalmente devido ao número crescente de culturas geneticamente modificadas para resistir à sua atividade herbicida. Sob essa óptica, cabe destacar que esse crescimento também se deve pelo aumento da resistência de ervas daninhas a esses compostos, resultando em um maior uso de herbicidas. Em consequência do seu uso generalizado, o glifosato é comumente mensurado em vários produtos alimentícios e fontes de água.

Quanto à exposição humana a essa substância, ela pode ocorrer por via alimentar a partir da ingestão de produtos alimentícios e água com resíduos de glifosato, mas também pode envolver potenciais exposições dérmicas e/ou por inalação de usuários ou indivíduos que vivem próximos de áreas agrícolas ou locais de produção. Nesse cenário, a literatura científica aponta que indivíduos expostos ao glifosato ocupacionalmente em comparação com a população em geral, apresentam níveis mais altos desse composto na urina e em outros fluídos biológicos (CURL *et al.*, 2020; GOMES, 2023; MOSER *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2021). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que o Nível Aceitável de Exposição Ocupacional seja de 0,1 mg/kg peso corpóreo/dia (ANVISA, 2020).

Outro aspecto a ser analisado reside no fato de que o glifosato é utilizado comercialmente apenas como componente (ingrediente ativo) de produtos formulados, que são misturas químicas complexas que incluem ingredientes adicionados intencionalmente como surfactantes, adjuvantes e conservantes, além de subprodutos da fabricação, como impurezas. Embora sejam considerados ingredientes “inertes”, eles podem ter perfis de toxicidade distintos e/ou podem influenciar a toxicidade do ingrediente ativo. A composição exata do

ingrediente, incluindo nomes químicos e concentrações normalmente é retida como informação confidencial (GOMES, 2023; MOSER *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2021).

Ademais, diferentes empresas produzem várias formulações com o mesmo ingrediente ativo e também podem alterar sua composição de ingrediente inerte para o mesmo produto ao longo do tempo. Nesse contexto, vários pesquisadores descobriram que os produtos formulados, incluindo os de glifosato, exibem maior toxicidade do que o ingrediente ativo sozinho. Além disso, estudos dos agentes contidos na formulação, como surfactantes e metais, demonstraram toxicidade significativa desses agentes, particularmente *in vitro* (MOSER *et al.*, 2022). Nesse escopo, em vista do potencial tóxico da adição do surfactante POEA em produtos formulados contendo glifosato, a última nota técnica da ANVISA estabelece que a concentração de POEA não deve exceder a concentração máxima de 20% da formulação. Quanto às impurezas toxicologicamente relevantes, como o N-nitrosoglifosato e o formaldeído, apresentam limites máximos definidos pela ANVISA de 0,001 g/kg e 1,0 g/kg respectivamente (ANVISA, 2020).

Embora a atenção científica e pública tenha se concentrado no potencial carcinogênico do glifosato, a neurotoxicidade tem sido descartada pelas agências reguladoras, as quais baseiam as suas decisões principalmente em um número limitado de estudos de toxicidade em animais. Cabe destacar que muitos desses estudos realizados utilizaram apenas o ingrediente ativo e não a formulação comercial, algo que não reflete o cenário real ao qual os seres humanos estão expostos. Além disso, a maioria dessas pesquisas experimentais utilizam vias de exposição que não mimetizam o uso ocupacional, como por exemplo, a via intraperitoneal. (CHANG; ODO; ACQUAVELLA, 2023; MOSER *et al.*, 2022).

1.2.1.1 NEUROTOXICIDADE DO GLIFOSATO

A avaliação da neurotoxicidade do glifosato (ou da formulação comercial) ainda é pouco estudada. Nesse cenário, é importante considerar as diferentes formas exposições e os parâmetros utilizados para avaliação do potencial efeito nocivo. Sendo assim, a medida da toxicidade aguda de uma substância é a dose letal para 50% da população (DL₅₀), ou seja, essa mensuração corresponde à

dose necessária para que determinada substância leve a óbito 50% da população testada. Nesse contexto, o glifosato foi amplamente considerado não tóxico devido a sua alta DL_{50} oral em ratos (5,6 g/kg) e camundongos (10 g/kg) em estudos agudos. Essa baixa toxicidade é consistente com estudos recentes que demonstraram que as formulações comerciais são geralmente mais tóxicas do que o glifosato isoladamente. Considerando que esse composto também pode ser pulverizado em campos agrícolas, outra medida importante é a concentração letal para 50% da população (CL_{50}), que corresponde à concentração de uma substância no ar que, por um determinado tempo, causa a morte de 50% da população estudada. Atualmente, a FAO estabelece que a CL_{50} do glifosato é superior a 5,46 mg/L no ar para um período de exposição de 4h (RICHARDSON *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2021).

Embora, a toxicodinâmica desse composto ainda não tenha sido determinada, algumas pesquisas sugerem que o glifosato inibe a enzima acetilcolinesterase (AChE) ao atingir, no soro humano, o IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% de uma resposta biológica) de 714 mM. Contudo, isso é muito maior do que as concentrações sanguíneas associadas a exposições indiretas (<0,05 mM) ou envenenamento agudo (0,05 – 5,0 mM) e, desse modo, parece improvável que esse seja um mecanismo de neurotoxicidade possível. Em termos de neuropatologia, estudos experimentais com *C. elegans* concluem que há neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos e γ -aminobutíricos, sendo preferencialmente afetados com formulações comerciais de glifosato em concentrações utilizadas por aplicadores de agrotóxicos. Esses achados foram atribuídos à inibição mitocondrial e aumento do estresse oxidativo (CHANG; ODO; ACQUAVELLA, 2023; MOSER *et al.*, 2022; RICHARDSON *et al.*, 2019).

A literatura também aponta que a exposição a formulações comerciais de glifosato pode levar ao desenvolvimento cerebral anormal em peixes-zebra e ratos, o que pode ser atribuído à excitotoxicidade do glutamato. Além disso, alguns estudos em roedores relatam um aumento de ansiedade e depressão que se correlacionaram com mudanças no número e diversidade da microbiota intestinal. Nesse cenário, é relevante destacar que muitas bactérias também dependem da via do ácido chiquímico para produção de aminoácidos cíclicos. Portanto, acredita-se que a inibição dessa via pelo glifosato pode diminuir o catabolismo do triptofano, o qual é precursor da serotonina, que desempenha

um papel importante tanto na ansiedade quanto na depressão. Dessa forma, esses estudos apoiam fortemente pesquisas adicionais sobre os potenciais efeitos neurotóxicos de herbicidas à base de glifosato (MOSER *et al.*, 2022; RICHARDSON *et al.*, 2019).

Embora existam estudos demonstrando o potencial neurotóxico do glifosato e suas formulações comerciais, mais pesquisas são necessárias para abordar as lacunas relacionadas aos mecanismos de neurotoxicidade e neuropatologia, mimetizando exposições ocupacionais e buscando compreender os efeitos nocivos para o sistema nervoso maduro.

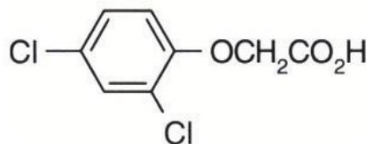
1.2.2 ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

O ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida sistêmico pré e pós-emergente amplamente utilizado para o controle de ervas daninhas de folhas largas e outras vegetações em pastagens, gramados, campos de golfe, florestas, estradas e parques. Foi o primeiro herbicida comercial a ser introduzido no mercado para o controle de ervas daninhas de folhas largas na década de 1940. Atualmente, o 2,4-D é o segundo herbicida mais aplicados no mundo devido ao seu baixo custo, seletividade, eficácia e amplo espectro. Além disso, as formulações comerciais de 2,4-D são facilmente solúveis em água e outros solventes, o que resulta em uma rápida penetração através das folhas/raízes, tornando-o um herbicida mais eficaz (GALLO *et al.*, 2023; ISLAM *et al.*, 2018; UEDA *et al.*, 2021a).

A fórmula estrutural do 2,4-D (Figura - 2) permite que ele mimetize a ação do fitohormônio auxina levando ao crescimento anormal, senescência e eliminação de ervas daninhas dicotiledôneas. As formulações comerciais à base de 2,4-D incluem ésteres, ácidos e inúmeros sais que variam em suas propriedades químicas, comportamento ambiental e, em menor grau, a toxicidade. As formulações de sal e éster de 2,4-D são derivadas da molécula de ácido original. O sal de dimetilamina (DMA) e o éster 2-etilhexil (EHE) são as formulações mais comumente utilizadas, representando aproximadamente 90 a 95% do uso total em todo o mundo. Além disso, mais de 1.500 formulados comerciais contêm 2,4-D como ingrediente ativo, o qual também fazia parte do Agente Laranja, o herbicida amplamente utilizado durante a guerra do Vietnã

(GALLO *et al.*, 2023; RICHARDSON *et al.*, 2019; SONG, 2014; UEDA *et al.*, 2021a).

Figura - 2: Fórmula estrutural do 2,4-D



Fonte: ANVISA, 2023.

A exposição humana ao 2,4-D pode ocorrer por via alimentar a partir da ingestão de produtos alimentícios e água com resíduos dessa substância, mas também pode envolver potenciais exposições dérmicas e/ou por inalação de usuários ou indivíduos que vivem próximos de áreas agrícolas e locais de produção. O ar contaminado com 2,4-D pode causar irritação, coceira, sensação de queimação na pele e falta de ar, enquanto sua ingestão resulta em vômitos, diarreia, dor de cabeça, lesão muscular esquelética, irritação, hipertensão, entre outros. Os seres humanos podem metabolizar o 2,4-D sendo excretado principalmente pela urina. Estudos demonstram que o 2,4-D está presente em amostras de urina de adultos e crianças, tendo maior concentração em trabalhadores expostos ocupacionalmente. A ANVISA determina que o Nível Aceitável de Exposição Ocupacional ao 2,4-D seja de 0,01 mg/kg de peso corpóreo/dia (ANVISA, 2023; ISLAM *et al.*, 2018).

Diversos estudos epidemiológicos, principalmente estudos de caso-controle e coorte, buscaram avaliar possíveis associações entre a exposição ao 2,4-D e múltiplos desfechos na saúde, incluindo efeitos respiratórios, endócrinos, oculares, imunológicos, neurológicos, reprodutivos, alteração do peso corporal e do desenvolvimento, vários tipos de câncer e morte. Entretanto, essas evidências são limitadas e controversas, uma vez que trabalhadores agrícolas provavelmente são expostos a vários produtos químicos, sendo difícil estabelecer uma relação nexa causal. Além disso, a interpretação dos dados apresenta outras limitações como a frequência/quantidade de uso de 2,4-D, duração da exposição e número restrito de casos (ATSDR, 2020).

A literatura apresenta uma ampla quantidade de estudos que avaliaram a toxicidade do 2,4-D em modelos animais, contudo essas dados são limitados quase que exclusivamente a via oral de exposição, sendo escassos estudos desenvolvidos com método inalatório e com formulados comerciais. Entre os efeitos sistêmicos relatados em estudos de exposição oral repetida em animais estão alterações hematológicas, efeitos no desenvolvimento, alterações hepáticas, renais, oculares e alterações nos níveis de hormônio tireoidiano em roedores (ATSDR, 2020).

1.2.2.1 NEUROTOXICIDADE DO 2,4-D

A neurotoxicidade do 2,4-D tem sido relatada em muitos estudos envolvendo intoxicações humanas e em modelos animais, sendo considerada como a toxicidade mais importante dessa substância. Apesar disso, ainda há muitas controvérsias e limitações nos dados, o que faz com que essa substância não seja mundialmente considerada neurotóxica por agências regulatórias. Além disso, é importante destacar que em muitos estudos há o envolvimento das indústrias fabricantes desses herbicidas, algo que deve ser ponderado na análise dos resultados obtidos (PASANDI et al., 2017).

Em relação a toxicodinâmica do 2,4-D, sabe-se que ele é prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal e, por falta de dados, acredita-se que ele também seja rapidamente absorvido pelo trato respiratório. No entanto, a absorção dérmica é relativamente baixa quando comparada ao trato gastrointestinal. O 2,4-D é capaz de se distribuir amplamente após a exposição oral, contudo sem se acumular nos tecidos, apresentando um metabolismo limitado. Essa substância é eliminada de forma relativamente rápida na urina e a sua toxicocinética é dependente da espécie e do sexo em grande parte devido a diferenças na depuração renal do 2,4-D. Os valores de DL_{50} do 2,4-D variam de 639 mg/kg a 1.646 mg/kg, enquanto a CL_{50} varia de 0,78mg/L a mais de 5,4mg/L em ratos, dependendo da apresentação química da molécula (ATSDR, 2020).

As evidências da neurotoxicidade do 2,4-D foram mais bem estudadas durante o neurodesenvolvimento e por vias que não mimetizam o uso ocupacional. Entre os efeitos citados constam a deposição inadequada de lipídios na bainha de mielina, interrupção da montagem do citoesqueleto,

desorganização do aparelho de Golgi, indução de astrogliose e efeito pró-apoptótico de células granulares do cerebelo. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam modificações no potencial da membrana mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO), depleção de antioxidantes e, conseqüentemente, a apoptose celular. Entre os efeitos comportamentais observados em modelos animais expostos ao 2,4-D estão a redução da atividade motora e alterações nos padrões locomotores. Em estudos neuroquímicos houve alterações nos níveis de serotonina e dopamina, além de seus metabólitos no tronco cerebral, nos núcleos estriado e arqueado (FREITAS et al., 2019; PASANDI et al., 2017).

Estudos sugerem que o 2,4-D pode modificar a integridade das células endoteliais e causar comprometimento da função da barreira hematoencefálica. Em avaliações histopatológicas de amostras de medula espinal, foi observada a perda de neurônios, edema, degeneração de corpúsculos de Nissl, núcleos picnóticos, gliose, presença de espaços intercelulares e vacuolização (FREITAS et al., 2019; PASANDI et al., 2017). O estudo de Ueda e colaboradores (2021), um dos poucos artigos encontrados envolvendo a exposição crônica por via inalatória ao 2,4-D em ratos adultos, demonstrou que houve um déficit nos testes neurocomportamentais e diminuição da espessura do córtex cerebral associado ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX (UEDA et al., 2021a).

Em humanos, estudos epidemiológicos e relatos de caso associaram à exposição ao 2,4-D com a doença de Parkinson, Transtorno do Espectro do Autismo, polineuropatia periférica persistente, degeneração ganglionar, redução da velocidade de condução nervosa e miotonia (PASANDI et al., 2017). Além disso, entre os efeitos neurológicos que foram relatados após intoxicação não letal pela ingestão de formulados comerciais contendo 2,4-D estão coma e ausência de reflexos. Em casos letais, a autópsia revelou várias petéquias em toda a substância branca do cérebro, edema encefálico e congestão acentuada. A exposição dérmica também provoca efeitos neurológicos, os quais afetam principalmente o sistema nervoso periférico e podem iniciar horas após o contato com a pele desprotegida. Em geral, os sintomas consistem em dor, parestesias e paralisias suficientemente graves para exigir a hospitalização do indivíduo. Nesses casos relatados na literatura, a recuperação foi lenta e alguns sintomas persistiram por anos após a exposição (ATSDR, 2020).

Embora existam evidências sobre a neurotoxicidade do 2,4-D, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de toxicidade envolvidos na exposição ocupacional e os respectivos efeitos no sistema nervoso maduro.

2. JUSTIFICATIVA

A crescente preocupação mundial com a segurança da utilização de agrotóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente tem motivado diversos estudos para avaliar a toxicidade dessas substâncias. Em especial, os herbicidas glifosato e o 2,4D, amplamente aplicados em escala global, constituíram-se como foco de muitas pesquisas sobre neurotoxicidade. Contudo, a maior parte delas se concentra em seus efeitos no desenvolvimento do sistema nervoso de roedores, o qual é naturalmente mais susceptível aos xenobióticos nessa etapa. Além disso, os delineamentos experimentais frequentemente utilizam doses altas e vias de exposição que não mimetizam o uso ocupacional e seus efeitos no sistema nervoso maduro (MAGOSSO, 2023; UEDA, 2020; UEDA *et al.*, 2021b).

Embora os mecanismos exatos de neurotoxicidade ainda não estejam completamente compreendidos, sabe-se que o glifosato e o 2,4D podem afetar os sistemas de sinalização neurotransmissora e os processos de estresse oxidativo no cérebro. A exposição a esses agrotóxicos também pode gerar mudanças comportamentais, induzindo ansiedade, alterações locomotoras e de memória em ratos adultos. A literatura aponta ainda que a exposição pré-natal e na infância ao glifosato, em áreas rurais com extensa aplicação, pode estar relacionada ao desenvolvimento do Transtorno do Espectro do Autismo. Além disso, alterações histopatológicas no encéfalo, tecidos musculares e em outros órgãos de diversos sistemas corporais também tem sido relatadas (BAIER *et al.*, 2017; DISNER *et al.*, 2021; UEDA, 2020; VON EHRENSTEIN *et al.*, 2019).

Embora existam estudos sobre a neurotoxicidade do glifosato e do 2,4D, são escassas pesquisas que abordem a saúde sensorial dos sistemas cocleares e vestibulares, os quais desempenham papel fundamental na orientação espacial, manutenção do equilíbrio e audição. Do mesmo modo, não há estudos avaliando o impacto da utilização dessas substâncias na neurofisiologia vocal. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo dessas estruturas em modelos animais após a exposição inalatória subcrônica a baixas

concentrações de agrotóxicos da classe dos inseticidas, mimetizando situações ocupacionais. Tais estudos têm evidenciado impactos na audição e em nervos periféricos envolvidos no controle vocal, sem haver alterações de parâmetros bioquímicos normalmente avaliados em saúde ocupacional estabelecidos pela legislação atual. Esses achados indicam que parâmetros auditivos e vocais, talvez possam atuar como bioindicadores para o monitoramento da exposição ocupacional a essas substâncias (CUNHA *et al.*, 2020; DOS REIS, 2021; MACEDO *et al.*, 2021).

Portanto, considerando a lacuna existente na literatura e ponderando a importância funcional dessas estruturas para a qualidade de vida humana, o presente estudo busca suprir essa demanda fornecendo dados sobre a neurotoxicidade decorrente da exposição inalatória subcrônica em ratos Wistar, mimetizando o uso ocupacional e correlacionando parâmetros comportamentais, auditivos, vestibulares, vocais, histopatológicos e neuroquímicos.

3. PROBLEMA DE PESQUISA

A exposição subcrônica por via inalatória aos formulados comerciais dos herbicidas glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético provoca danos ao sistema nervoso central e periférico, gerando alterações comportamentais, auditivas, vestibulares, vocais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos Wistar?

4. HIPÓTESE

Os formulados comerciais dos herbicidas glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético provocam danos ao sistema nervoso central e periférico, gerando alterações comportamentais, auditivas, vestibulares, vocais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos Wistar decorrente da exposição subcrônica inalatória.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a neurotoxicidade inalatória dos formulados comerciais dos herbicidas glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de parâmetros comportamentais, auditivos, histopatológicos e neuroquímicos em ratos Wistar.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a neurotoxicidade da exposição inalatória aos formulados comerciais dos herbicidas glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético em ratos Wistar por meio de parâmetros:

- Comportamentais, aplicando-se o Teste de Campo Aberto, Teste de Reconhecimento de Objetos, Teste do Labirinto em Cruz Elevado e Teste *Rotarod*;
- Auditivos, avaliando-se a via periférica através das Emissões Otoacústicas Evocadas por Produto de Distorção (EOAPD) e a via central por meio dos Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico (PEATE);
- Histopatológicos, utilizando-se a técnica histológica padrão com inclusão em parafina (laringe, língua, órgãos abdominopélvicos, torácicos e encefálicos), Microscopia Eletrônica de Varredura (cócleas e órgãos vestibulares) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (Nervo Laríngeo Recorrente e Nervo Vestibulococlear);
- Neuroquímicos, quantificando-se os neurotransmissores e seus metabólitos no córtex pré-frontal, bulbo olfatório, ponte, bulbo e cerebelo.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

Este projeto de pesquisa será executado através da cooperação interinstitucional entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Nesse cenário, considerando a execução prévia de outros estudos realizados com o mesmo protocolo experimental de exposição inalatória subcrônica de agrotóxicos, já padronizados e aprovados anteriormente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFCSPA sob parecer nº 321/15 e 323/15, o período experimental será realizado no Biotério da UFCSPA. As análises histomorfológicas em microscopia óptica e eletrônica dos tecidos coletados serão realizadas na UFRGS.

A equipe executora do projeto será composta por:

- Dra. Taís Malysz [Anatomista com 23 anos de experiência em ensaios com modelos animais (Mestrado, Doutorado)], orientadora e responsável pela condução das análises histomorfológicas em microscopia de luz e eletrônica (UFRGS).

- Dra. Eliane Dallegrave [Médica Veterinária com 25 anos de experiência em ensaios de avaliação de eficácia e segurança de compostos em modelo animal (Graduação, Mestrado, Doutorado, Pós-Doutorado)], co-orientadora e responsável pela condução dos ensaios *in vivo* (UFCSPA).

- Ms. Mateus Belmonte Macedo [8 anos de experiência em ensaios de avaliação de toxicidade em ratos (Iniciação Científica e Mestrado)], responsável por todas as etapas do projeto, sendo o coordenador da execução do mesmo, atuando tanto no ensaio *in vivo* com os animais (UFCSPA), quanto no processamento e análise histomorfológica das amostras (UFRGS).

Dra. Márcia Salgado Machado [Fonoaudióloga com 8 anos de experiência em ensaios de avaliação de ototoxicidade em roedores], atuando na interpretação da avaliação audiológica dos ensaios *in vivo* (UFCSPA).

- Dra. Sarah Carobini Werner de Souza Eller Franco de Oliveira [2 de experiência em ensaios de avaliação de toxicidade em roedores (Pós Doutorado)], atuando nas análises de neurotransmissores (UFCSPA).

- Dr. Charles Ferreira [15 anos de experiência em ensaios com roedores (Iniciação Científica, Mestrado, Doutorado e Pós- Doutorado)], atuando na interpretação da avaliação comportamental dos ensaios *in vivo* (UFCSPA).

- Ms. Dora de Athayde Saul [8 anos de experiência em ensaios de avaliação de toxicidade em modelo animal (Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado em curso)], atuando nos ensaios *in vivo* e nas análises de neurotransmissores (UFCSPA).

- Laura Ruzzarin [1 ano de experiência em ensaios de avaliação de toxicidade e analgesia em roedores (Iniciação Científica)].

6.2 ANIMAIS

No protocolo experimental serão utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar, com 60 dias, pesando aproximadamente $300 \pm 50\text{g}$, mantidos em condições controladas de biotério: ciclo claro/escuro de 12h, umidade (75-85%), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), acondicionados em caixas grandes

de polipropileno, 3 ratos por caixa, recebendo água e ração padronizada *ad libitum*. Os animais serão obtidos a partir do biotério da UFCSPA. Somente serão selecionados animais que não apresentem sinais de patologia de orelha externa e os quais as Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOAPD) estejam presentes em todas as frequências avaliadas (4, 6, 8, 10 e 12kHz).

O cálculo do tamanho amostral resultou em $n=12$ animais/grupo, sendo esta, a proporção de animais necessária para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando $\alpha=0,05$ e confiança de 95% (StatMate, Graphpad 2021). Ademais, estudos anteriores com essa amostragem provaram demonstrar diferença significativa entre os grupos (CUNHA *et al.*, 2020; DOS REIS, 2021).

6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais serão randomicamente alocados em 4 grupos diferentes: controle [$n=12$, expostos a água (veículo de diluição da formulação)], controle positivo para lesão vestibulococlear [$n=12$, tratados com 8mg/kg de cisplatina via intraperitoneal, por 3 dias, 24h antes da eutanásia], glifosato [$n=12$, expostos a 1/10 da Concentração Letal Inalatória (CL₅₀) do formulado comercial de glifosato (Roundup Original® Mais), (0,318 mg/L)] e 2,4D [$n=12$, expostos a 1/10 da CL₅₀ do formulado comercial de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D Tecnomyl®) (0,014 mg/L)] – (Tabela - 1 e Figura - 3). A exposição inalatória será realizada por 4h diárias, 5 vezes por semana, durante 8 semanas, com objetivo de mimetizar o uso ocupacional dessas substâncias. Durante a exposição, os ratos não terão acesso a água e comida. Ao longo de todo o estudo, os animais serão observados periodicamente quanto a ganho de massa corporal e sinais clínicos de toxicidade como:

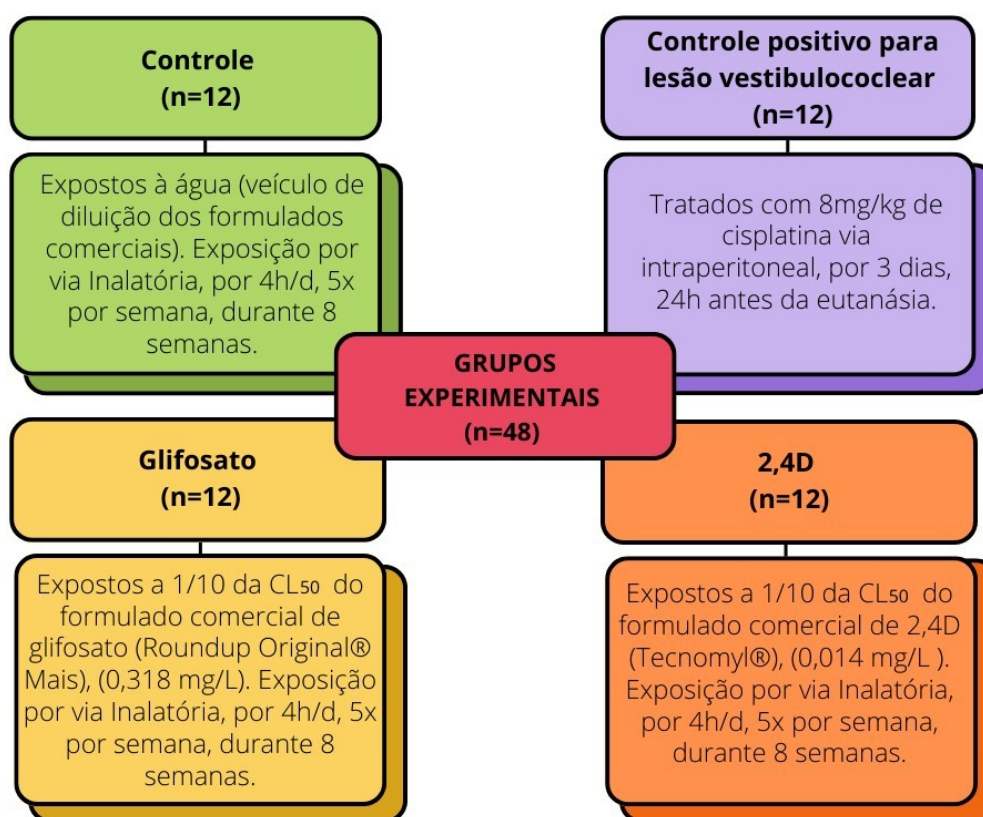
- Miose, sialorreia, lacrimejamento, rinorreia, contorções abdominais, diarreia, dispneia, hipersecreção brônquica (avaliação das manifestações muscarínicas);
- Tremores, taquicardia, arritmias cardíacas e insuficiência respiratória (avaliação das manifestações nicotínicas);
- Excitação, convulsões, depressão do centro respiratório e coma (avaliação das manifestações decorrentes do comprometimento do sistema nervoso

central); também serão avaliados sinais indicativos de possíveis alterações do sistema vestibular, como andar em círculos e perda de equilíbrio.

A exposição inalatória ocorrerá através de um sistema fechado composto por nebulizadores (Inalar Compact®) conectados nas entradas superiores e laterais das caixas de exposição inalatória (capacidade de 56L) e por aspiradores acoplados na saída inferior contralateral. Todos os fluxos serão regulados e padronizados (fluxo de entrada = fluxo de aspiração). O estudo experimental será realizado com base no Protocolo Nº 413 de Avaliação de Toxicidade Subcrônica Inalatória da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD (OECD, 2018).

Tabela - 1 – Grupos Experimentais do Estudo:

Grupo Experimental	Controle (n=12)	Controle positivo para lesão vestibulococlear (n=12)	Glifosato (n=12)	2,4D (n=12)
Tipo de Exposição	Expostos à água (veículo de diluição dos formulados comerciais). Exposição por via Inalatória, por 4h/d, 5x por semana, durante 8 semanas.	Tratados com 8mg/kg de cisplatina via intraperitoneal, por 3 dias, 24h antes da eutanásia.	Expostos a 1/10 da CL ₅₀ do formulado comercial de glifosato (Roundup Original® Mais), (0,318 mg/L). Exposição por via Inalatória, por 4h/d, 5x por semana, durante 8 semanas.	Expostos a 1/10 da CL ₅₀ do formulado comercial de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D Tecnomyl®) (0,014 mg/L). Exposição por via Inalatória, por 4h/d, 5x por semana, durante 8 semanas.

Figura - 3: Grupos Experimentais do Estudo:

Fonte: o autor.

6.4 ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO

A escolha da concentração inalatória que será utilizada de glifosato e 2,4-D foi fundamentada em estudos prévios a partir da CL₅₀ identificada para formulados comerciais. Além disso, o Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (NAEO) determinado pela ANVISA também foi ponderado para cada herbicida que será utilizado.

Primeiramente, destaca-se que os estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa evidenciaram alterações em parâmetros auditivos e em nervos periféricos motores da laringe em ratos Wistar expostos subcronicamente a concentrações de 1/10 da CL₅₀ dos formulados comerciais de agrotóxicos de diferentes classes utilizadas, sem alteração de outros parâmetros sistêmicos. Portanto, essas estruturas demonstram ser naturalmente mais sensíveis a neurodegeneração (CUNHA *et al.*, 2020; DOS REIS, 2021; MACEDO *et al.*, 2021).

A literatura evidencia que a CL_{50} do Roundup® para ratos é de 3,18 mg/L (WOW, 1994). Já o NAEQ definido pela ANVISA é de 0,1 mg/kg peso corpóreo/dia (ANVISA, 2020). Nesse contexto, outros estudos também exploraram diferentes concentrações, como a pesquisa de Gomes (2023) que expos ratos Wistar adultos machos a três diferentes concentrações de glifosato Roundup® cronicamente por via inalatória. As concentrações utilizadas foram classificadas em baixa (0,187mg/L), média (0,312 mg/L) e alta (0,467 mg/L), avaliando parâmetros da morfologia pulmonar e do hemograma de ratos. Os resultados do estudo evidenciaram alterações hematológicas após 6 meses de exposição, contudo não foram encontradas alterações na morfologia pulmonar em nenhuma das concentrações testadas, quando comparadas aos animais do grupo controle (GOMES, 2023). Considerando que nosso estudo propõe um modelo de exposição subcrônica, acredita-se que a exposição a uma concentração de 1/10 da CL_{50} 0,318 mg/L do formulado comercial de glifosato já seja capaz de evidenciar danos às estruturas do sistema nervoso periférico e central, principalmente aos órgãos sensoriais como o aparelho vestibulococlear e aos nervos motores da laringe.

Os valores da CL_{50} do 2,4-D variam de 0,78mg/L a mais de 5,4mg/L em ratos, dependendo da apresentação química da molécula (ATSDR, 2020). Apesar disso, conforme a bula do formulado comercial de 2,4-D da Tecnomyl®, a CL_{50} inalatória para ratos é >0,141 mg/L/4h (TECNOMYL, 2018). A ANVISA determina que o NAEQ do 2,4-D seja de 0,01 mg/kg de peso corpóreo/dia (ANVISA, 2023). Sob essa óptica, no estudo de Ueda (2020), ratos Wistar adultos machos foram expostos cronicamente por via inalatória ao 2,4-D (2,4-D Nortox®) em três concentrações diferentes por 6 meses para avaliação de neurotoxicidade, sendo classificadas em baixa (0,187 mg/L), média (0,313 mg/L) e alta (0,467 mg/L). Os resultados do estudo evidenciaram que o 2,4-D causou alterações de locomoção e no nível de ansiedade dos animais expostos em todas as concentrações, ocasionando necrose individual de neurônios e diminuição da espessura do córtex cerebral associada a aumento da expressão de BAX - marcador pró-apoptótico (UEDA, 2020). Portanto, considerando que nosso estudo propõe um modelo de exposição subcrônica, acredita-se que a exposição a uma concentração de 1/10 da CL_{50} 0,014 mg/L do formulado comercial de 2,4-D já seja capaz de evidenciar danos às estruturas do sistema

nervoso periférico e central, principalmente aos órgãos sensoriais como o aparelho vestibulococlear e aos nervos motores da laringe.

6.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

6.5.1 TESTE DE CAMPO ABERTO

O Teste de Campo Aberto será utilizado para avaliar a atividade motora, exploratória e emocionalidade dos roedores. Para isso, no início da tarefa, o animal é colocado, individualmente, no centro de uma arena dividida em 12 quadrantes e delimitada por paredes, e seus comportamentos serão filmados por 5 minutos. Os vídeos obtidos serão analisados posteriormente, sendo considerados os seguintes parâmetros: (1) frequência de cruzamentos entre as linhas demarcadas, (2) tempo de permanência na periferia da arena, (3) tempo de permanência no centro da arena, (4) tempo e número de vezes do comportamento de autolimpeza (*grooming*), (5) número de bolos fecais, (6) ocorrência de micção, (7) o número de ocorrência de estiramentos (*stretched attend postures*), (8) tempo de inatividade e (9) número de *rearings* (o rato apoia-se nos membros posteriores, eleva o tronco para farejar o ambiente verticalmente, apoiando ou não os membros anteriores nas paredes do campo). Entre um animal e outro, a arena será higienizada com solução etanólica de 70% para evitar a interferência do odor do animal anterior (CÔRTEZ, 2012; MONTANHA, 2015; ROYCE, 1997).

6.5.2 TESTE DE RECONHECIMENTOS DE OBJETOS

O Teste de Reconhecimento de Objetos será utilizado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos novos e já conhecidos. Para isso, os animais serão alocados na mesma arena utilizada no Teste de Campo Aberto por 5 minutos em dois dias consecutivos. No primeiro dia, irá ocorrer uma sessão de treino com duração de 5 minutos com dois objetos A1 e A2 idênticos, em que será avaliado o tempo de exploração de cada objeto. Para se avaliar a memória de curta duração, a tarefa acontecerá novamente 1 hora depois, sendo que o objeto A2 é trocado por outro (objeto B). Também ocorre a avaliação por 5 minutos do tempo de exploração dos objetos. Considerando que esse é um teste de memória com base na propensão natural dos animais para explorar novidades, serão contabilizados como atos exploratórios as ações de cheirar e

tocar os objetos. Para avaliar a memória de longa duração, o teste ocorre novamente, 24h depois, sendo que o objeto A2 é trocado por outro (objeto C). Entre um animal e outro, a arena será higienizada com solução etanólica de 70% para evitar a interferência do odor do animal anterior. O índice de reconhecimento é calculado para cada rato conforme estudos prévios (MONTANHA, 2015; PIETÁ DIAS *et al.*, 2007).

6.5.3 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O Teste do Labirinto em Cruz Elevado será utilizado para avaliação de ansiedade. O equipamento possui uma estrutura de quatro braços, a uma altura de 50cm do chão, tendo dois braços fechados opostos e dois braços abertos também opostos, todos conectados por uma plataforma central. Cada roedor será colocado isoladamente, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e, durante 5 minutos, serão registrados 14 parâmetros: (1) número de estiramentos (*stretched attend postures*), (2) número de *rearings*, (3) número e tempo de *grooming*, (4) número de bolos fecais, (5) ocorrência de micção, (6) tempo de latência da área central, (7) tempo de latência nos braços abertos, (8) tempo de latência nos braços fechados, (9) o primeiro sítio escolhido após o início do teste (braços abertos ou fechados), (10) número total de entradas nos braços abertos e fechados, (11) número de entradas nos braços abertos, (12) número de entradas nos braços fechados, (13) número de *head-dippings* (imersões de cabeça) nos braços abertos, (14) número e tempo de *freezing* e (15) número de quedas do braço aberto. A entrada é definida quando os quatro membros do animal estão por completo fora da plataforma central. Entre um animal e outro, o equipamento será higienizado com solução etanólica de 70% para evitar a interferência do odor do animal anterior (CÔRTES, 2012; PELLOW *et al.*, 1985).

6.5.4 TESTE ROTAROD

O Teste *Rotarod* será utilizado para avaliação da coordenação motora, equilíbrio e aprendizagem motora dos modelos animais. Inicialmente, serão realizadas sessões de treino com uma velocidade inicial de 24rpm, durante 60 segundos, 4 treinos por dia, durante 3 dias, sendo aferido o tempo de latência para a queda dos animais. Após as sessões de treino, o teste será realizado

utilizando 8 velocidades diferentes (5, 8, 15, 20, 24, 31, 33 e 44rpm) em duas tentativas em cada velocidade, sendo novamente aferido o tempo de latência para queda. Durante as testagens, o equipamento será higienizado frequentemente com solução etanólica 70%, visto que as fezes e a urina podem interferir negativamente no desempenho dos animais ao longo do teste (CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001; PINTO; KO, 2012).

6.6 AVALIAÇÕES AUDITIVAS

A avaliação auditiva periférica será realizada por meio do equipamento OtoreadClinical®, da marca Interacoustics®, através da análise das Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção (EOAPD), que avaliam a função coclear desde a espira basal até a espira apical e apresentam grande sensibilidade para detectar lesão das células ciliadas externas. Na pesquisa das EOAPDs serão utilizados dois tons puros de frequências primárias (F1 e F2), simultaneamente, a fim de evocar, por produto de distorção, as frequências de 4, 6, 8, 10 e 12kHz que serão avaliadas. O estímulo inicial de F1 e F2 será apresentado com uma intensidade de 65 e 55 dB NPS, respectivamente. De acordo com as especificações do aparelho, o nível mínimo de relação sinal/ruído para que as EOAPD sejam consideradas presentes será de 6 dB NPS. A sonda do equipamento será adaptada com uma oliva em tamanho pediátrico e o teste irá ocorrer sob o uso de anestesia com cetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal (FREITAS *et al.*, 2009). Serão realizadas duas avaliações, uma no início do estudo (pré-exposição – dia -2) e outra ao final (pós-exposição – dia 54). O grupo tratado com cisplatina sofrerá avaliação apenas imediatamente antes da 1ª administração e 24 horas após a 3ª administração. Os dados descritos nessa sessão são embasados em estudos prévios (CUNHA, 2018; CUNHA *et al.*, 2020).

A avaliação da integridade da via auditiva central será realizada mediante Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE). Os animais serão avaliados prévia e posteriormente à exposição aos agrotóxicos ou água; essa avaliação ocorrerá no início do estudo (pré-exposição – dia -2) e ao final (pós-exposição – dia 54). O grupo tratado com cisplatina sofrerá avaliação apenas imediatamente antes da 1ª administração e 24 horas após a 3ª administração. Os animais serão previamente anestesiados com cetamina (50mg/kg) e xilazina

(10mg/kg) via intraperitoneal, uma vez que o teste é sensível a movimentos; tais substâncias não interferem na obtenção do potencial, pois ele é exógeno (ZUCKI, 2013). O posicionamento dos eletrodos será: eletrodo ativo em Fz, eletrodos referência em M1 e M2 (mastoide esquerda e direita) e eletrodo terra na pata traseira. Os eletrodos serão pequenas agulhas semelhantes às de acupuntura. O aparelho utilizado será o Smart EP, 1 canal, marca IHS. O estímulo acústico será tipo clique monoaural, com duração de 0,1 ms, com polaridade rarefação, intensidade de 80dBNA, taxa de apresentação de 21.1 clique/seg e filtro passa banda de 100-3000 Hz. A janela utilizada será de 15 ms, incluindo 1 ms pré-estímulo para controlar atividade eletroencefálica dos animais. Serão realizados dois registros na intensidade determinada para cada orelha, com pro-mediação de 1000 estímulos, e quando houver reprodutibilidade de ondas a resposta será considerada presente. Serão medidas as latências absolutas em ms das ondas I, II, III e IV e os valores de intervalos interpicos. Não será considerada a onda V, já que esta pode ser atípica mesmo em ratos normais. O tempo médio dispendido para realização do exame é de no máximo 3 minutos (ZUCKI, 2013).

6.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

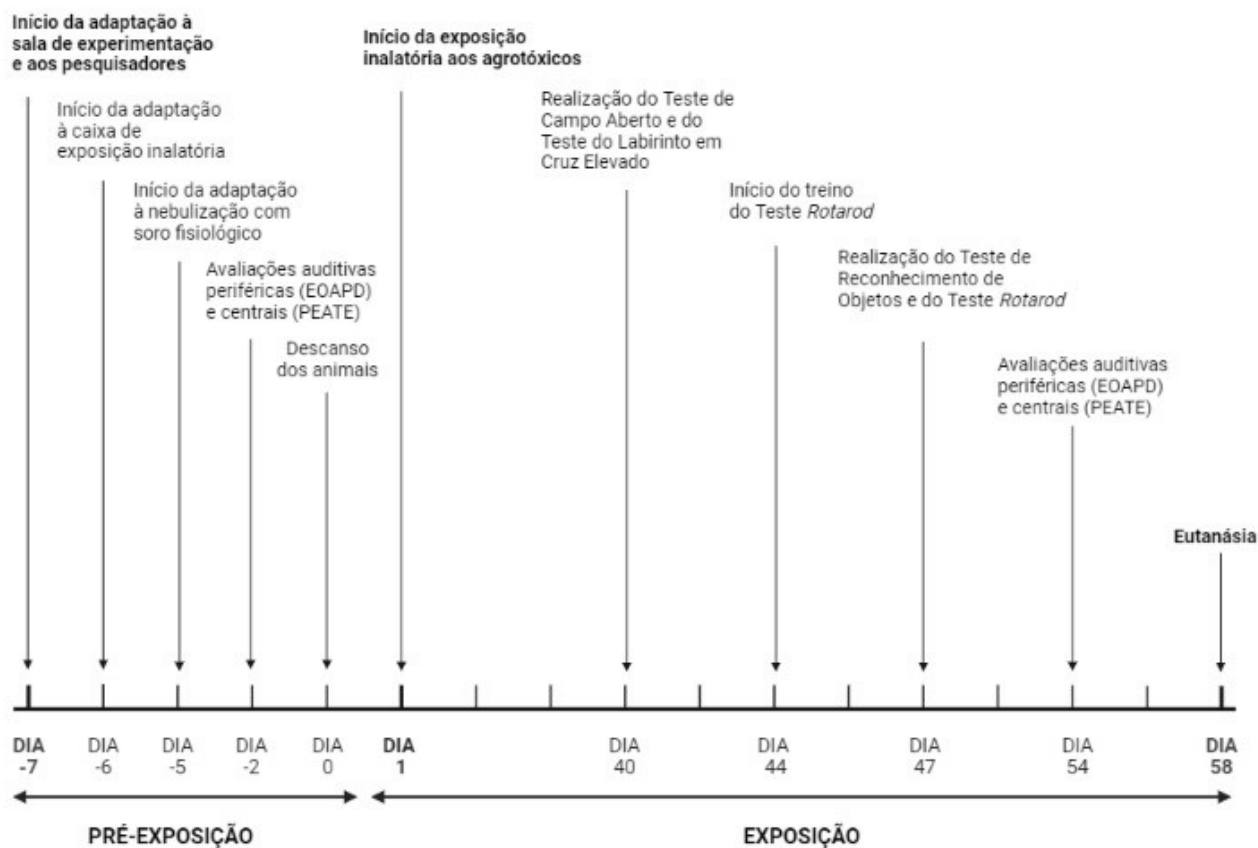
O experimento será realizado em dois blocos com 24 animais, 6 por grupo, sendo alocados três ratos por caixa. Inicialmente, haverá um período de ambientação com duração de 7 dias e, nessa etapa, acontecerão as avaliações auditivas periféricas (EOAPD) e centrais (PEATE).

A exposição inalatória será realizada para os grupos controle, glifosato e 2,4D, totalizando 18 animais por bloco. Por outro lado, nos dias 51, 52 e 53 seis ratos serão expostos a Cisplatina por via intraperitoneal (grupo controle positivo para lesão vestibulococlear), uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos (totalizando 24 mg/kg), a cada bloco. As avaliações auditivas serão realizada 24 horas após a última dose, sendo a eutanásia realizada logo após a última avaliação audiológica.

Ao final da sexta semana, os grupos controle, glifosato e 2,4D passarão pelo Teste de Campo Aberto e pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Ao final da semana seguinte, serão realizados o Teste de Reconhecimento de Objetos e o Teste *Rotarod*. No final da oitava semana, serão realizadas as avaliações

auditivas. No dia 58, 24 horas após a última exposição inalatória, será realizada a eutanásia dos animais. Todas as informações contidas nessa etapa estão de acordo com padrões estabelecidos em ensaios prévios de toxicidade experimental do grupo de pesquisa (CUNHA, 2018; CUNHA *et al.*, 2020; DOS REIS, 2021; MACEDO *et al.*, 2021).

Figura - 4 – Linha do tempo proposta.



Fonte: O autor, criado a partir do site "*BioRender.com*".

6.8 CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO DA PESQUISA

Os critérios de suspensão ou encerramento de determinados animais durante a pesquisa serão: diminuição igual ou superior a 20% de massa corporal do animal em teste; sinais clínicos de toxicidade severa, como convulsões, tremores excessivos, dispneia severa ou desidratação severa. O grau de severidade do presente estudo é moderado.

6.9 EUTANÁSIA

A eutanásia será realizada com o acompanhamento de uma médica veterinária e por um pesquisador experiente. No fim do período experimental (24h após a última exposição inalatória), será realizada a eutanásia mediante sobredosagem anestésica inalatória com isoflurano.

6.10 PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

6.10.1 COLETA DOS ÓRGÃOS

6.10.1.1 COLETA DA LARINGE E DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE

Após a eutanásia dos animais serão coletados, primeiramente, a laringe e os Nervos Laríngeos Recorrentes (NLRs), visando a preservação dessas estruturas, uma vez que os ratos serão decapitados posteriormente para retirada do encéfalo, dos ossos temporais e da língua, o que poderia danificar essas estruturas. A dissecação da laringe será realizada por meio de uma incisão longitudinal na região cervical anterior, abrindo-se as estruturas plano a plano, profundamente, sendo então retirada em bloco, em conjunto com os NLRs. Posteriormente, os NLRs serão dissecados com a utilização de um estereomicroscópio sendo seccionados com a extração de fragmentos de aproximadamente 4mm ao longo sulco traqueoesofágico direito e esquerdo, sendo imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH = 7,3) (MACEDO *et al.*, 2021).

6.10.1.2 COLETA DO ENCÉFALO

Após a retirada dos NLRs, os animais serão decapitados e o escalpo incisado na linha média, sendo, em seguida, divulsionado através de uma cureta para rebatimento das estruturas. Após a exposição da porção óssea, será realizada a fratura do crânio, delicadamente, a partir do forame magno em direção a calota craniana (eixo caudal-cranial e inferior-superior), utilizando-se um alicate de corte cirúrgico. Após, exposição superior completa do encéfalo, a estrutura será removida vagarosa e delicadamente, visando a preservação da maior porção possível do Nervo Vestibulococlear e, também, buscando a manutenção da integridade do osso temporal. Posteriormente, o encéfalo removido será dissecado e separado em córtex pré-frontal, bulbo olfatório, ponte, bulbo e cerebelo. As amostras coletadas serão divididas em dois grupos de igual

número, metade será levada para processamento histológico padrão, imediatamente fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (pH = 7,3) e o restante para avaliação de parâmetros neuroquímicos (descritos na seção 6.11).

6.10.1.3 COLETA DA LÍNGUA

Considerando o potencial dos herbicidas em promover mudanças estruturais no tecido muscular, optou-se por avaliar os possíveis efeitos da exposição inalatória na musculatura estriada que compõe a língua (LOPES *et al.*, 2020; NEGRÃO *et al.*, 2019). Dessa forma, após a retirada do encéfalo, a língua será removida por meio da incisão do assoalho da cavidade oral, seguido da dissecação da base, remoção completa do órgão e imediata fixação em solução de formalina tamponada a 10% (pH = 7,3). Para melhor fixação do tecido, a língua será seccionada em duas metades, conforme estudo prévio (EL-SAYED; AHMED; SELIM, 2018).

6.10.1.4 COLETA DO OSSO TEMPORAL E DO NERVO VESTIBULOCOCLEAR

Os ossos temporais serão coletados a partir da fratura da base do crânio, explorando-se especificamente a bula timpânica dos animais. Por meio de um estereomicroscópio, serão removidos a cóclea, os órgãos vestibulares e a porção distal remanescente do Nervo Vestibulococlear que serão imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, (pH = 7,3). A fim de garantir a preservação da citoarquitetura da porção membranosa dos órgãos, também será injetada solução fixadora através da janela redonda (COGO *et al.*, 2016; IHA; CRUZ, 2020).

6.10.1.5 COLETA DO SANGUE, ÓRGÃOS ABDOMINOPÉLVICOS E TORÁCICOS

Na etapa seguinte, os animais terão seu abdômen incisado, acessando-se a cavidade abdominopélvica para coleta do sangue através da veia cava caudal, com auxílio de uma seringa e, posteriormente, transferido para um tubo contendo EDTA. O sangue será coletado para avaliação hematológica (hemograma) e bioquímica (AST, ALT, Creatinina e CK) para que haja uma avaliação da concentração sérica de ureia, creatinina, transaminases, fosfatase alcalina e amilase. Na sequência, serão removidos o fígado, rins, glândula

suprarrenal, baço, pâncreas e, via intrapélvica, os testículos. Posteriormente, a cavidade torácica será explorada a partir da dissecação do diafragma, seguida da inserção de uma tesoura reta de ponta romba para fratura das costelas bilateralmente, para acesso e retirada dos pulmões e coração. Todos os órgãos coletados serão cuidadosamente dissecados para remoção de tecidos adjacentes, seguido da respectiva mensuração da massa em balança analítica que, posteriormente, será relacionada com a massa corporal de cada animal. Após, os tecidos coletados serão imediatamente fixados em solução de formalina tamponada a 10% (pH = 7,3).

6.10.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICOS

6.10.2.1 TÉCNICA HISTÓLOGICA PADRÃO

As laringes, as línguas, os órgãos abdominopélvicos, torácicos e encefálicos removidos serão processados através de técnica histológica padrão. Após a pesagem em balança analítica, os materiais biológicos obtidos, com exceção dos testículos, serão fixados em solução de formalina tamponada a 10%, por um período mínimo de 24h. Os testículos, por outro lado, serão conservados através do fixador Bouin. Após, todos os órgãos serão desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados, por meio de xilol, e embebidos em parafina líquida (56 a 60°C). Posteriormente, os blocos de parafina, já solidificados, serão seccionados em fragmentos de 5 µm, aderidos sobre lâminas de vidro, corados com Hematoxilina/Eosina e observados em microscópio óptico através de objetivas de 10, 20, 40 e 100x (SILVA; CORREIA, 2021).

6.10.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Após a fixação inicial com glutaraldeído, durante 48h, as cócleas e os órgãos vestibulares serão submetidos a duas lavagens de 1h e descanso durante a noite na solução de tampão fosfato 0,1M (pH = 7,3) para remoção completa do fixador. Posteriormente, o material ficará submerso em solução de EDTA dissódico tamponado a 10% por 12 horas para descalcificação. Com uma lâmina de bisturi e uma microtesoura de cirurgia otológica a cápsula ótica será removida e, na sequência, o modíolo em conjunto com o órgão de Corti.

Posteriormente, serão dissecadas e removidas as máculas do sáculo e do utrículo bilateralmente.

Os órgãos sensoriais dissecados serão submetido à desidratação em soluções de concentração crescente de acetona (50%, 70% e 90%) durante 30 minutos cada e três imersões de 30 minutos em acetona 100%. Na sequência, o material será levado para a secagem em equipamento de ponto crítico, no qual as amostras serão submetidas a diversos banhos em dióxido de carbono (CO₂) líquido para retirada de toda a água e toda a acetona ainda presentes. Esse espécime final será fixado e montado em suporte adequado com o uso de pasta condutiva, recoberto com uma camada fina de ouro de 24 quilates e visualizado no microscópio eletrônico de varredura.

A avaliação das células ciliadas externas da cóclea será padronizada pela análise estrutural dos estereocílios, sendo que as células que apresentarem estereocílios com forma e disposição perfeitas serão consideradas íntegras. Por outro lado, células com estereocílios ausentes, disforme ou em padrão de desarranjo serão consideradas lesadas. Já, a análise das células ciliares das máculas do sáculo e do utrículo serão avaliadas por meio da contagem do número de tufo ciliares na região da estríola presentes por campo fotográfico. O aumento de 3.500 vezes será padronizado para todas as fotografias (COGO *et al.*, 2016; FINCKLER, 2010; IHA; CRUZ, 2020; SOMDAŞ *et al.*, 2020).

6.10.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Após a fixação inicial na solução de paraformaldeído e glutaraldeído, durante 48h, os Nervos Laríngeos Recorrentes e Vestibulococleares serão pós-fixados em solução de Tetróxido de Ósmio (OsO₄) a 1%, desidratados em concentrações crescentes de acetona, infiltrados em resina e polimerizados a 60°C. Posteriormente, serão seccionados transversalmente por meio de um ultramicrotomo, utilizando-se de uma navalha de vidro, obtendo-se cortes semifinos na espessura de (1 µm), aderidos em lâminas de vidro e corados com solução de azul de toluidina a 1%. As imagens dos nervos serão capturadas por meio de um microscópio óptico com câmera acoplada, utilizando-se a objetiva de 100x, sendo avaliadas por meio do software Zen Blue (ZEISS - Alemanha). De acordo com o protocolo de morfometria planar, serão analisados 11 parâmetros em ambos os nervos: (1) densidade das fibras mielinizadas

(fibras/mm²), (2) área intraperineural (mm²), (3) número total de fibras mielinizadas (fibras/nervo), (4) área das fibras mielinizadas (μm²), (5) área axonal das fibras mielinizadas (μm²), (6) diâmetro das fibras mielinizadas (μm), (7) diâmetro axonal das fibras mielinizadas (μm), (8) espessura da bainha de mielina (μm), (9) grau de mielinização (*g-ratio*) das fibras mielinizadas, (10) porcentagem da área total ocupada pelas fibras mielinizadas, (11) porcentagem da área total ocupada pelo tecido conjuntivo endoneural (MACEDO *et al.*, 2021).

Para análise no MET, serão selecionadas as porções de interesse nos nervos para serem cortadas em um ultramicrotomo, utilizando-se uma navalha de diamante, em secções ultrafinas de 70 nm que serão colocadas em telas de cobre de 300 *meshs*. Esses espécimes, em seguida, serão submetidos a dupla coloração, utilizando-se solução aquosa de acetato de uranila a 1%, por 30 minutos, e em solução de citrato de chumbo, por cinco minutos, sendo posteriormente observados no MET. As imagens das amostras serão capturadas e analisadas quanto a integridade das fibras, células de Schwann e da ultraestrutura dos nervos (DE VASCONCELOS *et al.*, 2011; TESSEMA *et al.*, 2009; YOSHIMATSU *et al.*, 2020).

6.11 PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS

O córtex pré-frontal, bulbo olfatório, ponte, bulbo e cerebelo removidos de cada animal serão acondicionadas em frascos de plástico e congeladas a -40° para análise neuroquímica. Para a avaliação dos parâmetros neuroquímicos será realizada a quantificação de neurotransmissores como dopamina (DA), serotonina (5-HT), noraepinefrina (NE), ácido gama-aminobutírico (GABA) e acetilcolina (ACh), assim como seus metabólitos. Como método de análise será utilizada cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-HRMS).

As amostras serão submetidas a uma etapa pré-analítica que consistirá na homogeneização de 50 mg de amostra em 500 uL de água mili-Q, sob banho de gelo. Uma alíquota de 100 μL do homogenato será utilizada para a análise dos neurotransmissores, com a adição de 380 μL da mistura de solventes (75% acetonitrila e 25% acetona) e 20 μL de padrão interno dopamina-*d*₄. As amostras serão homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 15 min a 15.000 rpm. Em seguida, alíquotas de 450 μL serão secas sob fluxo de ar, ressuspensas em

30 µL de água ultrapura e alíquotas de 20 µL serão injetadas no sistema analítico.

As análises serão realizadas com ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo, a partir de parâmetros de ionização pré-definidos e conduzidas através de um método proposto e validado *in house* na Central Analítica da UFCSPA (VIANA *et al.*, 2022).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados serão submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade, sendo os dados paramétricos apresentados como média e desvio padrão e comparados entre os grupos por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados sobre a massa corporal relativa serão apresentados como média e erro padrão da média, sendo comparados entre os grupos por ANOVA de medidas repetidas. Os dados não paramétricos serão apresentados por sua mediana, quartis (Q1 e Q3), mínimo, máximo e amplitude interquartil (IQR). Os grupos serão comparados através do teste Kruskal Wallis, seguidos do pós-teste de Dunn. As análises estáticas serão realizadas através do software Statistical Package for Social Science (SPSS – Versão 29.0 – IBM).

8. ASPECTOS ÉTICOS

O tamanho amostral está de acordo com o preconizados para o ensaio de Avaliação de Toxicidade Inalatória da OECD (Nº 413) e todos os procedimentos serão realizados de acordo com a legislação vigente no Brasil por meio da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e com o Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como a Resolução Nº 879, de 15 de fevereiro de 2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV (BRASIL, 2008, 2009; CFMV, 2008).

A pesquisadora responsável pelos ensaios *in vivo* é a Médica Veterinária Eliane Dallegrave, que executará os procedimentos e eutanásia dos animais. Ao final do estudo, as carcaças serão acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e encaminhados para a câmara fria do biotério da UFCSPA, para posterior encaminhamento à empresa *Ambientus* Tecnologia Ambiental Ltda.

Análise neuroquímica e histopatológica				X	X	X	X	X				
Escrita do artigo 2								X	X	X	X	X
2026	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Escrita do artigo 3	X	X	X	X								
Escrita do artigo 4					X	X	X	X				
Submissão dos manuscritos para publicação									X	X	X	X
2027	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Defesa da Tese de Doutorado				X								

10. PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

O planejamento da produção científica oriunda do desenvolvimento deste estudo prevê a elaboração de quatro artigos, sendo eles:

- Artigo 1: Avaliação dos efeitos da exposição inalatória subcrônica aos herbicidas Glifosato e 2,4D na audição de ratos Wistar.
- Artigo 2: Avaliação dos efeitos da exposição inalatória subcrônica aos herbicidas Glifosato e 2,4D no equilíbrio de ratos Wistar.
- Artigo 3: Avaliação dos efeitos da exposição inalatória subcrônica aos herbicidas Glifosato e 2,4D na neurofisiologia vocal de ratos Wistar.
- Artigo 4: Avaliação dos efeitos neurotóxicos da exposição inalatória subcrônica aos herbicidas Glifosato e 2,4D no comportamento, histopatologia e neuroquímica de ratos Wistar.

11. ORÇAMENTO

Todos os equipamentos necessários ao desenvolvimento do projeto encontram-se disponíveis nas instituições e acessíveis ao grupo de pesquisa. Os materiais de custeio serão obtidos por meio de financiamento próprio dos pesquisadores.

Descrição/Material	Quantidade	Preço Unitário (R\$)	Total (R\$)
Kit Olivas para aparelho de otoemissões acústicas	1 unidades	1.300,76	1.300,76
Lâmina para microscopia fosca (caixa com 50 unidades)	5 unidades	11,44	57,20
Bulbo conta-gotas (20 unidades)	1 Unidade	58,28	58,28
Microtubo Eppendorf 2 mL (500 unidades)	1 unidade	29,00	29,00
EDTA dissódico (250g)	1 Unidade	376,71	376,71
Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado (500g)	1 Unidade	50,00	50,00
Fosfato de Sódio Bibásico (500g)	1 Unidade	37,08	37,08
Operação do Aparelho de Ponto Crítico – UFRGS - CMM	24 Unidades	30,00	720,00
Metalização – UFRGS - CMM	48 Unidades	2,50	120,00
Operação do MEV (por hora)	24 unidades (24h)	80,00	1.920,00
Operação do MET (por hora)	12 unidades (12h)	100,00	1.200,00
Total (R\$):	-----	-----	5.869,03

Fonte de financiamento: serão utilizados recursos próprios dos pesquisadores e dos parceiros do grupo de pesquisa, verbas institucionais (PROAP), bem como o projeto será submetido a editais de agências de fomento.

12. REFERÊNCIAS

ANVISA. **Monografia de Agrotóxicos - 2,4-D**. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4285json-file-1>. Acesso em: 6 jan. 2023.

ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 12/2020/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**. Apresenta as conclusões da reavaliação do Glifosato após a consolidação das contribuições da Consulta Pública nº 613, de 28 de fevereiro de 2019 e as recomendações para proposição de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC). Brasília, 2020. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/Nota+Técnica+Final+-+Reavaliação+do+Glifosato.pdf/9f513821-c4e5-4be3-a538-ef1947034272>. Acesso em: 9 jun. 2023.

ATSDR. Toxicological Profile for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). **Toxicological Profile for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37023232/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

BAIER, C. J. *et al.* Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and teratology**, [s. l.], v. 64, p. 63–72, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29061523/>. Acesso em: 27 fev. 2023.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 19 abr. 2023.

BRASIL. **Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009**. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília, 2009. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm. Acesso em: 18 fev. 2023.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 18 fev. 2023.

BURALLI, R. J. *et al.* Occupational exposure to pesticides and health symptoms among family farmers in Brazil. **Revista de saude publica**, [s. l.], v. 54, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33331527/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor Coordination and Balance in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, New Jersey, v. 15, n. 1, p. 8.12.1-8.12.14, 2001.

CFMV. **Resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008**. Dispõe sobre o uso de animais no ensino e na pesquisa e regulamenta as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) no âmbito da medicina veterinária e da zootecnia brasileiras e dá outras providências. Brasília, 2008. Disponível em: <http://ts.cfmv.gov.br/manual/arquivos/resolucao/879.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2023.

CFMV. **Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Brasília, 2012. Disponível em: <http://ts.cfmv.gov.br/manual/arquivos/resolucao/1000.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CHANG, E. T.; ODO, N. U.; ACQUAVELLA, J. F. Systematic literature review of the epidemiology of glyphosate and neurological outcomes. **International archives of occupational and environmental health**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 1–26, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35604441/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

COGO, L. A. *et al.* Análise morfológica do sistema vestibular de cobaias intoxicadas por organofosforado. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 82, n. 1, p. 11–16, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjorl/a/TZHz5LVQdf9LfTvWRwCqPJ/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 20 fev. 2023.

CÔRTEZ, R. S. **Infarto do Miocárdio como Modelo de Depressão em Ratos: Estudo Seriado**. 2012. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/3742>. Acesso em: 19 fev. 2023.

COSTAS-FERREIRA, C.; DURÁN, R.; FARO, L. R. F. Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35562999/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Metallic complexes with glyphosate: a review. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1038–1045, 2005. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/yNyGrTWjHPzFMhRxSYFwtSz/?lang=pt>. Acesso em: 9 jun. 2023.

CRESTO, N. *et al.* Pesticides at brain borders: Impact on the blood-brain barrier, neuroinflammation, and neurological risk trajectories. **Chemosphere**, [s. l.], v. 324, p. 138251, 2023. Disponível em: Acesso em: 7 jun. 2023.

CUNHA, E. O. **Avaliação da ototoxicidade da cipermetrina em ratos Wistar**. 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2018. Disponível em: <http://repositorio.ufcspa.edu.br/handle/123456789/924>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CUNHA, E. O. *et al.* Ototoxicity of cypermethrin in Wistar rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 86, n. 5, p. 587–592, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjorl/a/49mtty9PRZpJ6p8PMRLNnvL/abstract/?lang=en>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CURL, C. L. *et al.* Synthetic Pesticides and Health in Vulnerable Populations: Agricultural Workers. **Current environmental health reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 13, 2020. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC7035203/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

DE CAMPOS, D. *et al.* Degree of myelination (g-ratio) of the human recurrent laryngeal nerve. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, [s. l.], v. 271, n. 5, p. 1277–1281, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00405-013-2690-y>. Acesso em: 20 fev. 2023.

DE VASCONCELOS, C. A. C. *et al.* Transmission Electron Microscopy Studies of the Vestibulocochlear Nerve in Chronic Diabetic Rats. **Int. J. Morphol.**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 272–277, 2011.

DISNER, G. R. *et al.* The Toxic Effects of Glyphosate, Chlorpyrifos, Abamectin, and 2,4-D on Animal Models: A Systematic Review of Brazilian Studies. **Integrated Environmental Assessment and Management**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 507–520, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ieam.4353>. Acesso em: 27 fev. 2023.

DORFMAN, A.; REKOWSKY, C. J. Geografia do Contrabando de Agrotóxicos na Fronteira Gaúcha. **Revista Geográfica de América Central**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–16, 2011.

DOS REIS, A. **Ototoxicidade induzida pela exposição a agrotóxicos: estudo em modelo animal**. 2021. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2021. Disponível em: <http://repositorio.ufcspa.edu.br/handle/123456789/1938>. Acesso em: 24 fev. 2023.

EL-SAYED, N. M.; AHMED, A. A. M.; SELIM, M. A. A. Cytotoxic effect of chlorpyrifos is associated with activation of Nrf-2/HO-1 system and inflammatory response in tongue of male Wistar rats. **Environmental Science and Pollution**

Research, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 12072–12082, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-1391-x>. Acesso em: 21 fev. 2023.

FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022**. 1. ed. Rome: FAO, 2022. *E-book*. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc2211en/online/cc2211en.html>. Acesso em: 24 abr. 2023.

FINCKLER, A. D. **Aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e ginkgo biloba**. 2010. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/6485>. Acesso em: 20 fev. 2023.

FREITAS, L. M. *et al.* Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. **Human & experimental toxicology**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1178–1182, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31256685/>. Acesso em: 1 jul. 2023.

FREITAS, M. R. de *et al.* Papel da apoptose na ototoxicidade por cisplatina em ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 745–752, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjorl/a/ZKJNLynWzw4X5vB9Yk6hJcr/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 24 fev. 2023.

GALLO, N. C. *et al.* Toxicity of fipronil and 2,4-D pesticides in *Daphnia similis*: a multiple endpoint approach. **Environmental science and pollution research international**, [s. l.], v. 30, n. 23, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37052836/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

GOMES, G. V. C. **Comparação morfológica pulmonar e do hemograma de ratos expostos cronicamente por via inalatória e oral aos herbicidas glifosato e 2,4-D**. 2023. Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2023. Disponível em: Acesso em: 10 jun. 2023.

IHA, L. C. N.; CRUZ, O. L. M. Use of scanning electron microscopy in the cochlea of guinea pigs. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 86, n. 2, p. 222–227, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bjorl/a/YjNwWtMFtgrz5Fz9dBzLc9L/?lang=en&format=html>. Acesso em: 20 fev. 2023.

ISLAM, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, [s. l.], v. 111, p. 332–351, 2018. Disponível em: Acesso em: 30 jun. 2023.

LOPES, F. S. *et al.* Análise dos efeitos da exposição crônica oral ao herbicida à base de glifosato na remodelação cardíaca em ratos. **Colloquium Vitae**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 10–15, 2020. Disponível em: <https://revistas.unoeste.br/index.php/cv/article/view/3790>.

MACEDO, M. B. *et al.* Morphometric Evaluation of the Recurrent Laryngeal Nerve of Wistar Rats Exposed to Pesticides. **Journal of Voice**, [s. l.], 2021. Disponível em: Acesso em: 20 fev. 2023.

MAGOSSO, N. **Efeitos do consumo da dieta ocidental e da exposição aos herbicidas glifosato e 2,4D sobre a próstata de camundongos**. 2023.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biomédicas) -

Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2023. Disponível em:

<http://hdl.handle.net/11449/239537>. Acesso em: 27 fev. 2023.

MONTANHA, F. P. **Perinatal exposure of Wistar rats to fipronil: toxicological effects on the generation and development of offsprings**.

2015. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/142993>. Acesso em: 18 fev. 2023.

MOSER, V. C. *et al.* Glyphosate and neurological outcomes: A systematic literature review of animal studies. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 162–209, 2022.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35676826/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

NEGRÃO, A. L. R. *et al.* Effect of Short-Term Inhalation of The Herbicide 2,4D on Cardiac Remodeling: Morphological Aspects. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, [s. l.], v. 32, p. 247–252, 2019. Disponível em:

<http://www.scielo.br/ijcs/a/WL7Tdk3TfbxzZ8RS7d3fWJD/?lang=en>. Acesso em: 21 fev. 2023.

OECD. **Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study**. Paris:

OECD, 2018. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-413-subchronic-inhalation-toxicity-90-day-study_9789264070806-en.

Acesso em: 18 fev. 2023.

PEHAR, V. *et al.* Selected herbicides screened for toxicity and analysed as inhibitors of both cholinesterases. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 379, p. 110506, 2023. Disponível em: Acesso em: 7 jun. 2023.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985. Disponível em: Acesso em: 19 fev. 2023.

PIETÁ DIAS, C. *et al.* Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. **Neuroscience**, Amsterdam, v. 146, n. 4, p. 1719–1725, 2007. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17445991/>. Acesso em: 18 fev. 2023.

PINTO, W. B. V. R.; KO, G. M. The Rotarod test: contributions to the study of neuromuscular diseases, extrapyramidal syndromes and cerebellar ataxia.

RESBCAL, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 202–212, 2012.

RICHARDSON, J. R. *et al.* Neurotoxicity of pesticides. **Acta neuropathologica**, [s. l.], v. 138, n. 3, p. 343–362, 2019. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31197504/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

ROYCE, J. R. On the construct validity of open-field measures. **Psychological Bulletin**, Washington, v. 84, n. 6, p. 1098–1106, 1997.

SHARIFI PASANDI, M. *et al.* Epi/perineural and Schwann Cells as Well as Perineural Sheath Integrity are Affected Following 2,4-D Exposure.

Neurotoxicity research, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 624–638, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28699141/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

SILVA, H. T. H.; CORREIA, L. L. **Manual eletrônico sobre artefatos durante a preparação de lâminas histológicas**. Curitiba: Appris Editora, 2021.

SOARES, D. *et al.* Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8622992/](https://pmc/articles/PMC8622992/). Acesso em: 9 jun. 2023.

SOMDAŞ, M. A. *et al.* Efeito protetor da N-acetilcisteína na ototoxicidade por cisplatina em ratos: um estudo com testes auditivos e microscopia eletrônica de varredura. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 30–37, 2020. Disponível em:

<http://www.scielo.br/j/bjorl/a/DtsJVbbntgfcYVFFfrSL73j/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 20 fev. 2023.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **Journal of integrative plant biology**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 106–113, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24237670/>. Acesso em: 30 jun. 2023.

TECNOMYL. **Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico - 2,4-D Tecnomyl**. Foz do Iguaçu: [s. n.], 2018. Disponível em: <https://tecnomyl.com.br/bulas/2,4-D Tecnomyl-BULA.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2023.

TESSEMA, B. *et al.* Observations of recurrent laryngeal nerve injury and recovery using a rat model. **The Laryngoscope**, [s. l.], v. 119, n. 8, p. 1644–1651, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lary.20293>. Acesso em: 20 fev. 2023.

UEDA, R. M. R. **Neurotoxicidade associada à exposição crônica via inalatória e via oral ao ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos**. 2020. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2020. Disponível em: <http://bdtd.unoeste.br:8080/jspui/handle/jspui/1341>. Acesso em: 27 fev. 2023.

UEDA, R. M. R. *et al.* Neurotoxicity associated with chronic exposure to dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) - a simulation of environmental exposure in adult rats. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, [s. l.], v. 56, n. 8, p. 695–705, 2021a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34125002/>. Acesso em: 7 jun. 2023.

UEDA, R. M. R. *et al.* Neurotoxicity associated with chronic exposure to dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) – a simulation of environmental exposure in adult rats. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1939622>, [s. l.], v. 56, n. 8, p. 695–705, 2021b. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2021.1939622>. Acesso em: 27 fev. 2023.

VIANA, R. R. *et al.* Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of neurotransmitters in rat brain tissue exposed to 4'-fluoro- α -PHP. **Biomedical Chromatography**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. e5487, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmc.5487>. Acesso em: 21 fev. 2023.

VON EHRENSTEIN, O. S. *et al.* Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study. **BMJ**, [s. l.], v. 364, p. 962, 2019. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/364/bmj.l962>. Acesso em: 27 fev. 2023.

WOW. **Environmental Health Criteria 159 - Glyphosate**. 1. ed. Geneva: World Health Organization, 1994.

YOSHIMATSU, M. *et al.* Recurrent laryngeal nerve regeneration using a self-assembling peptide hydrogel. **The Laryngoscope**, [s. l.], v. 130, n. 10, p. 2420–2427, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lary.28434>. Acesso em: 20 fev. 2023.

ZUCKI, F. **Potencial evocado auditivo de tronco encefálico e análise proteômica em ratos expostos a chumbo e suplementados com ferro**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-11112013-160056/pt-br.php>. Acesso em: 24 fev. 2023.

Investigação dos mecanismos celulares e moleculares associados à imunossupressão sistêmica em pacientes com glioblastoma

Pesquisador responsável: Elizandra Braganhol

Abstract:

Introduction: Glioblastoma is the most common cerebral tumor that challenges the actual advances in immunotherapy. Its aggressiveness, invasion, chemoresistance, including other factors contribute to an alarmant scenario with no parallel to other tumors. In recent years, many researchers have contributed with advances in the knowledge of the tumor structure and its relationship with the tumor microenvironment (TME) that results in a severe immunosuppression and a modulation of immune cells by multiple mechanisms - including the adenosinergic pathway that has emerged as a key point. However, the patients also present a systemic immunosuppression that is poorly understood and investigated. Considering the importance of adenosine in TME, in this proposal we intend to investigate the adenosinergic pathway in the peripheral immune system: characterizing this pathway in patients, understanding its relation with peripheral immune cells. To complete this aim, we are going to use techniques such as PCR, HPLC, flow cytometry and cell culture. At the end of this project, we expect to better understand the role of adenosine in systemic immunosuppression.

Key-words: glioblastoma, adenosine, systemic immunosuppression, immunotherapy

Resumo:

Introdução: O glioblastoma é o tumor cerebral mais comum que desafia os recentes avanços em imunoterapia. Sua agressividade, invasão, quimiorresistência, entre outros fatores contribuem para um cenário alarmante sem paralelo com outros tumores. Nos últimos anos, muitos pesquisadores contribuíram com avanços no conhecimento da estrutura do tumor e sua relação com o microambiente tumoral (MAT) que resulta em uma imunossupressão severa e uma modulação de células imunes por múltiplos mecanismos - incluindo a via adenosinergica que surgiu como um ponto-chave. No entanto, os pacientes também apresentam imunossupressão sistêmica pouco compreendida e investigada. Considerando a importância da adenosina no MAT, nesta proposta pretendemos investigar a via adenosinergica no sistema imune periférico: caracterizando esta via em pacientes e entendendo sua relação com células imunes periféricas. Para cumprir este objetivo, utilizaremos técnicas como PCR, HPLC, citometria de fluxo e cultura de células. Ao final deste projeto, esperamos entender melhor o papel da adenosina na imunossupressão sistêmica.

Palavras-chave: glioblastoma, adenosina, imunossupressão sistêmica, imunoterapia

Introdução

O câncer é uma doença multifatorial que matou 9,6 bilhões de pessoas em 2018, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021)). Os tumores cerebrais não são os mais prevalentes na população. Porém, devido às particularidades cerebrais, como por exemplo, a presença de barreira hematoencefálica (BBB) e o lapso de drenagem linfática convencional, ainda é um desafio encontrar alternativas de tratamento nestes casos (2).

O glioblastoma (GB) é um câncer cerebral que afeta cerca de 180.000 pessoas todos os anos nos Estados Unidos (EUA) e tem uma taxa de incidência de 3,19 por 100.000 pessoas, o que torna o GB o tumor cerebral primário mais comum e agressivo devido à sua alta invasividade, a propensão a se dispersar por todo o parênquima cerebral e a elevada vascularização que torna esses tumores extremamente recidivantes (3,4). A sobrevida é estimada em 15 meses, enquanto apenas 5% dos pacientes sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico (5).

Classicamente, os gliomas são divididos por sua histologia em quatro classes: astrocitoma, oligoastrocitoma, oligodendroglioma e glioblastoma. A classificação mais recente vem da OMS (2016) e considera alguns parâmetros genotípicos, por ex. o status IDH e exclusão 1p / 19q, para diagnosticar. O IDH - isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 / IDH2 - mutação foi um parâmetro adicionado devido à sua importância em GB: IDH-tipo selvagem é o mais frequente (~ 90% dos casos) e predomina em GB primário. IDH-mutante (~ 10% dos casos) corresponde ao GB secundário - aquele que trata de um glioma de grau inferior. Outro tipo é denominado GB NOS, quando a avaliação IDH não está disponível (6,7).

GB compartilha características de células gliais, como expressão de GFAP e vimentina. Como outros cânceres, o processo de desenvolvimento de tumores envolve alterações genéticas, como alterações na proteína tumoral p53 (TP53) - um ponto de verificação do ciclo celular, fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) - um gene supressor de tumor, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que induz proliferação e angiogênese e subunidade reguladora 1 da fosfoinositídeo-3-quinase (PIK3R1); esses genes atuam em funções supressoras de tumor (8,9).

Em condições fisiológicas, o microambiente cerebral é formado pela BBB, neurônios, células gliais e células do sistema imunológico. A BBB contribui para manter um ambiente estável regulando o transporte de moléculas, incluindo oxigênio, pequenas moléculas lipofílicas e glicose (10). A microglia influencia as decisões de destino do progenitor neural, ativação de astrócitos, homeostase neuronal e sinaptogênese (11).

Os astrócitos estão envolvidos na comunicação à distância, integração de informações e suporte

metabólico (12). As células imunes no cérebro são mais representadas por linfócitos, células T reguladoras e uma pequena porcentagem de monócitos / macrófagos infiltrantes, células B entre outros, que estão localizados principalmente nas meninges e no plexo coróide (Korin et al, 2017).

Porém, em situações patológicas que incluem o processo de desenvolvimento e progressão tumoral, o microambiente cerebral sofre alterações substanciais, tornando-se um ecossistema complexo que promove o escape da vigilância imunológica, auxiliando no crescimento do câncer e na resistência ao tratamento. O microambiente tumoral (MAT) é composto por diferentes tipos de células: células estromais, endoteliais e imunes: macrófagos associados a tumores (TAMs), células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), células T regulatórias (Treg) e células assassinas naturais (NK). Essas células, combinadas com citocinas, matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento e condições como hipóxia e acidose, juntas, estimulam a imunossupressão (10,14). A BBB é alterada de forma a prejudicar a liberação do fármaco para as células tumorais (15,16) e permite mudanças no microambiente.

As células residentes, como microglia e células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs) e células periféricas, como monócitos / macrófagos e neutrófilos, são recrutadas para a área do tumor e uma modulação acontece para escapar do sistema imunológico. A microglia e TAMs são recrutados por fatores, por ex. proteína quimioatraente de monócitos - 1 e 3 (MCP- 1, MCP - 3), fator de crescimento de hepatócitos e fator de dispersão (HGF / SF), fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos - 1 (CSF - 1) enquanto secretam IL-6, IL-1 β , TGF- β e outros (8).

O crosstalk entre as células tumorais e imunes (figura 2) induz um perfil “pró-tumoral / imunossupressor” nas células imunes, gerando um sistema complexo de citocinas, receptores e moléculas imunomoduladoras. Podemos citar: IL-6 que promove migração e reduz a apoptose, IL-1 β - envolvida na proliferação, aumento da atividade ERK, invasividade e resistência aos medicamentos. O TNF- α , aliás, aumenta a invasão e sua estimulação também regula positivamente a expressão da proteína ERK (17). TGF- β e IL-8 que desempenham um papel no crescimento tumoral e na angiogênese (8,18,19). A IL-10 está envolvida no crescimento e proliferação celular e desregula a apresentação do antígeno (20).

As opções clássicas de tratamento no GB incluem cirurgia seguida de quimioterapia com temozolomida (TMZ) e radioterapia. Nos últimos anos, muitas terapias foram propostas, incluindo inibidores do ponto de controle imunológico, células CAR-T, vacinas contra tumores, vacinas de células dendríticas (DC) e terapia gênica viral.

Apesar dos avanços, o GB se mantém refratário a novas terapias e até mesmo a imunoterapias que sucedem a outros tipos de tumor, e. anti-PD-1 (nivolumabe) e anti-CTLA-4 (ipilimumabe).

O bevacizumabe (terapia com anticorpo monoclonal anti-VEGF) foi o último medicamento aprovado pelo FDA, mas o tratamento não resultou em vantagem significativa para o desfecho dos pacientes (5,21,22).

Nesse cenário, outros alvos continuam sendo identificados como potenciais - principalmente a via adenosinérgica e o CD73, que pertence à via de sinalização purinérgica (22,23). GB apresenta um amplo espectro de células envolvidas no microambiente, mas é importante notar que, ao contrário de outros tumores como melanoma e pulmão, é considerado um tumor frio devido à falta de infiltração de células T tumorais - e a principal população de células T é composto por Treg (4,14). Considerando o infiltrado imune mais mieloide, entender os mecanismos de regulação e como controlar essa “conversa tumor-células imunes” parece ser uma abordagem interessante no desenvolvimento de novas terapias.

Nesse sentido, a sinalização purinérgica surgiu nos últimos anos como um importante ponto-chave para a evasão imune em GBs e outros tumores (24). Quando o ATP é liberado em um meio extracelular, por mudanças na pressão osmótica, estresse celular por cisalhamento ou apoptose - através dos canais de membrana da superfície celular (por exemplo, panexina 1), ele atua como um padrão molecular associado a danos (DAMP) estimulando os receptores purinérgicos P2, que estão localizados na membrana celular de células tumorais e imunes (25,26). Os receptores P2 são ainda classificados em 2 classes: P2X (1-7) - canais iotrópicos e P2Y1,2,4,6,11,12,13,14 - receptores acoplados à proteína G. Os receptores P2X são sensibilizados exclusivamente por ATP, enquanto P2Y são estimulados por nucleotídeos de purina e pirimidina, incluindo ATP, ADP, UTP e UDP (27).

Quando os receptores purinérgicos são sensibilizados, os sinais gerados induzem a quimiotaxia de neutrófilos, agregação plaquetária, quimiotaxia e ativação de granulócitos, macrófagos e monócitos (28). Caso contrário, o ATP pode ser convertido pela família das ectonucleotidases: NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfato-hidrolase), como o CD39 hidrolisa ATP extracelular em AMP, que é subsequentemente convertido em adenosina (ADO) pela ecto-5'-nucleotidase / CD73 (25, 29).

ADO, por sua vez, pode ser convertida em inosina pela ADA ou interagir com os receptores P1: subdivididos em quatro classes: A1, A2A, A2B e A3. Os receptores A1 são expressos em neutrófilos e DCs imaturos e estão envolvidos na quimiotaxia de neutrófilos. A2A é expresso na maioria das células imunes e plaquetas, promovendo respostas imunossupressoras/imunomoduladoras em células imunes e prevenindo a agregação de plaquetas. A2B é expresso em macrófagos, DCs e mastócitos, promovendo a liberação de IL-6 e VEGF por macrófagos e DCs e direcionando a degranulação dos mastócitos. Por fim, A3

também é expresso em neutrófilos e mastócitos, reduzindo a quimiotaxia de neutrófilos e estimulando a degranulação dos mastócitos (28).

ADO, em geral, antagoniza a resposta inflamatória do ATP e estudos têm demonstrado seus principais papéis em tumores que incluem: polarização de macrófagos M2, expansão de MDSC, polarização de células CD4 + em Treg, redução da resposta Th1 e diminuição de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) enquanto aumentam a produção de VEGF e IL-8 (contribuindo para a progressão do tumor) (30). Em GB, a principal fonte de ADO é pela conversão de AMP por CD73.

CD73 é superexpresso em muitos tumores - por exemplo, câncer de pulmão, melanoma, câncer gástrico, tireóide e outros e está correlacionado com um pior prognóstico para os pacientes (31–34). Foi se concretizado como alvo de imunoterapia nos últimos anos devido ao seu papel fundamental na produção de ADO, uma vez que conecta vias canônicas e não canônicas: a forma canônica de ATP via atividade de CD39 e não canônica de NAD + a ADPR, por meio da ação de CD38 e de AMP por CD203a / PC-1 (35).

Pesquisas recentes do nosso grupo demonstraram o potencial do bloqueio do CD73 como alvo da terapia com GB - visando ao comprometimento da sinalização do ADO no microambiente - com redução do volume tumoral, taxas de migração, invasividade e alteração do perfil imunológico (36,37).

Apesar dos avanços na compreensão dos efeitos do ADO e dos modelos pré-clínicos com foco em tumores e seu microambiente, e mais recentemente em seus papéis em exossomos e comunicação à distância, essas descobertas não são traduzidas na prática clínica (38,39). Um caso geralmente esquecido é a imunossupressão sistêmica que no GB pode contribuir para o fracasso dos tratamentos, mas não está bem caracterizada.

Normalmente, os autores demonstram os mecanismos imunossupressores no MAT, porém existem poucas pesquisas com foco nos aspectos periféricos: Zisaski e colegas (2007) demonstraram um perfil Th2 em linfócitos de pacientes com GB (40). Vasco e colegas (2013) mostraram que os sobrenadantes coletados de linhagens de células GB foram mais atraentes para os linfócitos T reguladores (Treg) quando comparados ao meio padrão completo em uma forma dependente de MCP-1 (CCL-2) (41). Estudos recentes descobriram que pacientes com GB têm células supressoras derivadas de mielóide (MDSCs) aumentadas no sangue periférico, células T CD73^{high} CD4 +, apresentam a forma solúvel de CD73 e mostraram aumento dos receptores A2A, demonstrando alguns insights na imunossupressão periférica de GB (21,42) .

Nosso grupo está interessado no microambiente imunológico e na sinalização purinérgica na periferia imunossupressora da GB. Os dados preliminares mostraram que nos pacientes o estado

imunossupressor no sangue periférico com níveis elevados de IL-10 e MCP-1 persiste após a remoção do tumor por cirurgia e tratamento (dados não publicados).

Esses dados combinados com a literatura anterior apresentada acima indicam que a periferia contribui para a progressão do tumor - e provavelmente - reincidência. Novos pontos de verificação estão surgindo, especialmente o eixo “CD39-CD73-ADO-receptores P1” em GB, demonstrado por nosso grupo e outros (36,43,44).

Com base no MAT, que mostra altos níveis de ADO combinados com os dados de que pacientes com GB apresentam exossomos contendo ADO, CD39 e CD73, hipotetizamos que este eixo pode ser alterado não apenas no MAT local, mas no sistema periférico: um CD73 alto O ambiente aumenta os níveis circulantes de ADO, sensibilizando os receptores P1 nas células imunes, agindo periféricamente para gerar progressão tumoral e resistência ao tratamento. Este projeto tem como objetivo explorar qual é o papel da via de sinalização adenosinérgica para o estabelecimento e manutenção da imunossupressão periférica associada ao GB.

Objetivos

Objetivo Principal: Avaliar a participação da sinalização adenosinérgica na imunossupressão periférica associada ao GB e sua contribuição para o crescimento tumoral.

Objetivos Específicos:

- 1) Caracterizar as vias de produção de ADO de células imunes periféricas in silico
- 2) Caracterizar a sinalização purinérgica em células imunes periféricas e soro em pacientes com GB e comparar com o microambiente tumoral
- 3) Avaliar o impacto dos mediadores circulantes GB na diferenciação das células imunológicas periféricas

Metodologia

População e aspectos éticos

Todos os procedimentos serão realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil. Este estudo usará amostras de pacientes > 18 anos com diagnóstico de GB ou pessoas saudáveis que assinaram o TCLE. Todos os pacientes que aceitarem participar da pesquisa assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Será assegurado o direito à confiabilidade dos dados e o cuidado na utilização das informações nos trabalhos escritos, de modo que os participantes não possam ser identificados.

Crítérios de inclusão dos pacientes: O paciente ter fornecido consentimento termo de consentimento livre e esclarecido por escrito antes de qualquer procedimento relacionado ao

estudo. O paciente ter no mínimo 18 anos de idade e no máximo 70 anos. O paciente ter diagnóstico de GBM (OMS grau IV) confirmado por histopatologia central, de qualquer linhagem molecular. O paciente ser homem ou mulher não-grávida e não-lactante.

Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado com o auxílio do serviço de estatística da UFCSPA considerando um erro α de 0.05 e um poder ($1 - \beta$) 0.90 e o valor de “N” estimado foi de 50 pacientes e 50 indivíduos saudáveis que serão utilizados como controle para as análises realizadas em soro.

Coleta de biópsias de GBMs

O procedimento cirúrgico será conduzido de forma habitual, sem acrescentar ou remover etapa da técnica padrão necessária durante a remoção do tumor. Os fragmentos que normalmente são retirados do tumor em quantidade suficiente para confecção do exame anatomopatológico serão separados. Outra parte destes fragmentos que são normalmente retirados dentro do processo de remoção tumoral será separada para o banco de tumores, utilizando a técnica descrita a seguir. No momento da cirurgia, os fragmentos tumorais serão retirados e submetidos a distintos tipos de análise: 1) amostras armazenadas em PFA-10%: essa etapa já está incorporada na rotina das cirurgias de retirada de tumor e tem como finalidade a realização da análise histopatológica dos tumores via técnica de coloração de eosina/ hematoxilina, a fim de caracterizar o tipo tumoral e avaliar o grau de malignidade do mesmo; 2) amostras que serão utilizadas nesse projeto serão armazenadas em (a) tampão PBS que tem como finalidade proteger o tecido tumoral e manter a integridade celular para a extração de macrófagos associados ao tumor e (b) RNAlater amostras que serão utilizadas para as análises moleculares de qPCR e sequenciamento.

Coleta de sangue

As amostras de sangue (20 mL) dos pacientes com GBM e dos indivíduos controles serão coletadas por punção venosa em tubo a vácuo com ou sem anticoagulante. O desconforto que poderá ocorrer se resume à picada da agulha e sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxado, mas não requer nenhum cuidado especial voltando ao normal em poucos dias. Com relação aos potenciais riscos os quais os pacientes poderão estar submetidos, declaramos que o estudo oferece riscos limitados à saúde física ou mental do paciente, pois trata-se apenas da coleta de sangue para exames que usualmente ocorre como parte do acompanhamento clínico, que poderá provocar dor/desconforto no local da picada, e de coleta de biópsias de tecido tumoral por meio de neurocirurgia. Não será realizado nenhum tipo de intervenção ou modificação na terapia dos pacientes e a coleta das amostras não promoverá um

aumento adicional dos riscos associados ao tratamento.

Perfil da sinalização purinérgica em células imunológicas periféricas: análise in silico

A fim de caracterizar a produção de ADO em ambiente periférico de pacientes com GB, os genes dos receptores canônicos (ENTPD1, NT5E e ADA), não canônicos (CD38 e ENPP1), P1 (ADORA 1, ADORA2A, ADORA2B e ADORA 3) e transportador de nucleosídeos (NTP1) será avaliado em conjuntos de monócitos, neutrófilos, MDSCs, linfócitos (CD4 +, CD8 + e Treg) e células NK para pacientes com GB e comparados com dados de profissionais de saúde. Bancos de dados (por exemplo: TCGA, Gene Expression Omnibus) contendo as informações de expressão de genes dos tipos de células necessários serão a fonte de informações. Os conjuntos de dados gerados serão analisados por R ou Python após anotação e normalização. Os genes de pacientes com GB serão comparados com dados de profissionais de saúde. A expressão diferencial será considerada estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0,05$ usando testes estatísticos apropriados.

Esta análise dará instruções para a análise in vitro de células do sistema imunológico. Pretendemos ver alterações que forneçam informações sobre quais células estão liderando a imunossupressão periférica.

Dosagem de nucleotídeos e nucleosídeos no soro dos pacientes

ATP, ADP, AMP, ADO e inosina serão avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) utilizando o método descrito por Bertoni e colaboradores (45). O soro será aplicado em HPLC de fase reversa Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão) através de um Shimadzu (150 × 4,6 mm × 5 µm) acoplado a uma coluna de guarda Shimadzu Shim-pack GVP-ODS (4,6 × 10 mm). A eluição será realizada em gradiente de 100% do solvente A a 100% do solvente B (solvente A mais 30% de metanol) em um período de 42 min (vazão de 1,0 mL / min). A medição será avaliada por absorção a 254 nm e comparado com os tempos de retenção dos padrões de purinas.

Caracterização das vias adenosinérgicas no soro de pacientes

Para caracterizar a via adenosinérgica em pacientes pretendemos avaliar a expressão de CD39, CD73, CD38 e CD203a / PC-1 por citometria de fluxo. O qPCR também será utilizado para avaliar os genes descritos acima mais os receptores P1 (A1, A2a, A2b e A3). As células serão extraídas do soro do paciente para que tenham os seguintes conjuntos: monócitos, neutrófilos, linfócitos (CD4 +, CD8 + e Treg) e células NK. Os perfis de imunofenótipo serão avaliados usando os marcadores na Tabela 1. Os resultados serão comparados com as amostras de tumor pareadas por paciente.

A citometria de fluxo será realizada no BD FACS Canto II. As células isoladas serão incubadas

com o anticorpo “anti-humano” adequado seguido de incubação com anticorpos secundários conjugados. Os anticorpos necessários para marcar as células estão listados na tabela 2 e serão diluídos conforme especificado pelo fabricante.

Tabela 1: Marcadores de células imunes para citometria de fluxo

Tipo celular	Marcadores
Monócito	CD14, HLA-DR+, CD11b
Neutrófilo	MPX (CD66b, CD11b)
Linfócito CD4+	CD3, CD4
Linfócito CD8+	CD3, CD8
Linfócito Treg	FOXP3 (CD39, CD73)
Natural killers	CD16, CD56
MDSC	CD66b, CD33

Tabela 2: Anticorpos necessários para avaliação da produção de ADO por citometria de fluxo

Marcador	Anticorpo	Referência
CD39	Rabbit anti-human	http://ectonucleotidases-ab.com/documents/humanNTPDase1_hN1-.pdf
	NTPDase1	http://ectonucleotidases-ab.com/documents/humanNTPDase1_hN1-.pdf
CD73	Rabbit anti-human CD73	http://ectonucleotidases-ab.com/documents/human5-nucleotidase.pdf
CD38	Anti-CD38 antibody [R4106]	https://www.abcam.com/cd38-antibody-4106-ab108403.html
NPP1 (CD203a/PP1)	Guinea pig anti-human NPP1	http://ectonucleotidases-ab.com/documents/humanNPP1_GP.pdf

A fim de avaliar a funcionalidade das enzimas envolvidas na via ADO canônica, a atividade

enzimática das enzimas CD39, CD73 e ADA será avaliada posteriormente no soro dos pacientes pelo método de Chan (46). ATP, ADP, AMP e ADO serão dados como substrato e condições ideais de pH, temperatura, e cada cofator enzimático será utilizado para otimizar a reação. A atividade será comparada com soro de doadores saudáveis.

Diferenciação das células imunes

Para verificar o impacto dos mediadores solúveis do GB nas células imunes periféricas, um tipo de célula será selecionado para expandir a análise: o tipo de célula alvo será escolhido com base em resultados *in silico*. Para exemplificar as próximas etapas, o subconjunto de monócitos será usado. Primeiramente, monócitos serão isolados do soro de doadores saudáveis utilizando Ficoll Ficoll-Hypaque para purificação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (47).

Para responder se os mediadores solúveis das células tumorais são capazes de diferenciar as células imunológicas periféricas, os monócitos serão expostos a exossomos de pacientes com GB ou soro de pacientes - a fim de mimetizar os fatores periféricos em circulação. Os exossomos serão isolados e caracterizados conforme descrito por Ludwig e colaboradores (38). O controle positivo será feito por monócitos expostos ao fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e monócitos cultivados em meio DMEM com 10% de SFB serão utilizados como controle negativo. O perfil de citocinas será posteriormente avaliado por citometria de fluxo. As células serão marcadas para CD14 e CD11b. Células com perfil de sopro CD14^{high}CD11⁺ serão consideradas monócitos e perfis CD14^{high}CD11b^{high} serão considerados macrófagos.

Para identificar o fenótipo diferencial de células imunes, monócitos de doadores saudáveis serão cultivados com soro de pacientes com GB e posteriormente avaliados por citometria de fluxo para os seguintes marcadores: HLA-DR, CD206, CD163 e receptor Toll-like 4 (TLR4). HLA-DR^{high} serão considerados macrófagos M1, enquanto CD206^{high}CD163^{high} serão macrófagos M2.

Espera-se que os macrófagos TAM sejam semelhantes aos macrófagos M2, conforme amplamente descrito na literatura. Os grupos experimentais e controles com cada uma das respectivas condições de cultura são apresentados a seguir (Tabela 3). Os monócitos cultivados com pacientes ou soro de doadores de saúde serão comparados com os controles.

Grupo	Tratamento
Controle	DMEM + 10% SFB
M1 controle	DMEM +IFN- γ + LPS

M2 controle	DMEM + IL-4
Exossomos	DMEM + exossomos de pacientes com GB
Soro Controle	DMEM + 10% soro doadores saudáveis
Grupo Teste	DMEM + 10% de soro de pacientes com GB

Tabela 3: Grupos experimentais e tratamentos

Para avaliar as citocinas produzidas pelas células imunes em contato com o GB, será realizado um ensaio transwell. Os monócitos de doadores de saúde ou linhagem de monócitos HL-60 serão semeados no fundo da placa transwell. A fim de mimetizar BBB, uma monocamada de células hCMEC / D3 será semeada na parte superior do transwell.

Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo serão analisados através do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”). Os dados obtidos serão testados para normalidade e serão analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste múltiplo de Duncan ou Tukey quando indicado ou Mann-Whitney em caso de não distribuição normal. Dados serão considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$ para um intervalo de confiança de 95%.

Resultados esperados

No final deste projeto, esperamos compreender melhor o papel da via adenosinérgica no sangue periférico de pacientes com GB. Os pacientes com GB apresentam uma imunossupressão sistêmica que é mal compreendida. A produção de ADO é muito bem caracterizada como um mecanismo imunossupressor no microambiente local do GB. Esperamos que, devido à sua importância na TME, esta via seja regulada positivamente na circulação periférica dos pacientes - como pesquisas anteriores demonstraram que os exossomos GB apresentam as enzimas e ADO em sua composição. Também esperamos ver uma modulação de monócitos: sua diferenciação para macrófagos e polarização para um perfil “como M2”.

Cronograma

Etapas	Início	Término
Apreciação Ética	02/05/2022	30/05/2022
Estudos <i>in silico</i>	01/07/2022	28/07/2023
Atividades <i>in vitro</i>	01/07/2022	31/07/2026
Divulgação de resultados	03/08/2026	31/08/2026

Elaboração de relatório técnico e prestação de contas	03/08/2026	31/08/2026

Orçamento:

Material	Custo (R\$)
Material de uso geral (luvas, tubos de coleta de sangue, plásticos)	5.000
Reagentes para citometria	10.000
Material para cultura celular	10.000
Reagentes para isolamento das células	5.000
Anticorpos	10.000
Material para biologia molecular	10.000
Custo total:	50.000

Referências

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Available at: < https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Last access in June 12th, 2021.
2. Dutoit V, Migliorini D, Dietrich PY, Walker PR. Immunotherapy of malignant tumors in the brain: How Different from other sites? [Internet]. Vol. 6, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2016 [cited 2021 Jun 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28003994/>
3. Schwartzbaum J, Fisher JL, Aldape K, Schwartzbaum JA, Aldape KD, Wrensch M. Article in Nature Clinical Practice Neurology. 2006 [cited 2021 Jun 12]; Available from: www.nature.com/clinicalpractice/neuro
4. D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM. Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue [Internet]. Vol. 11, Cancers. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 12]. p. 469. Available from: www.mdpi.com/journal/cancers
5. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. CA Cancer J Clin [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Jun 12];70(4):299–312. Available from:

<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21613>

6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–20.
7. Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. Vol. 44, *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2018. p. 139–50.
8. Mostofa AGM, Punganuru SR, Madala HR, Al-Obaide M, Srivenugopal KS. The process and regulatory components of inflammation in brain oncogenesis. *Biomolecules.* 2017;7(2):1–33.
9. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: Advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Cancer.* Nat Rev Cancer; 2010 [cited 2021 Jun 12]. p. 319–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20414201/>
10. Da Ros M, De Gregorio V, Iorio AL, Giunti L, Guidi M, de Martino M, et al. Glioblastoma chemoresistance: the double play by microenvironment and blood-brain barrier [Internet]. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2018 [cited 2021 Jun 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248992/>
11. Wright-Jin EC, Gutmann DH. Microglia as Dynamic Cellular Mediators of Brain Function [Internet]. Vol. 25, *Trends in Molecular Medicine.* Elsevier Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 12]. p. 967–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597593/>
12. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain [Internet]. Vol. 222, *Brain Structure and Function.* Springer Verlag; 2017 [cited 2021 Jun 12]. p. 2017–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28280934/>
13. Korin et al, 2017 _ infiltrado imune naive brain.pdf.
14. Seano G. Targeting the perivascular niche in brain tumors [Internet]. Vol. 30, *Current Opinion in Oncology.* Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2021 Jun 12]. p. 54– 60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29135607/>
15. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery [Internet]. Vol. 12, *Drug Discovery Today.* Drug Discov Today; 2007 [cited 2021 Jun 12]. p. 54–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17198973/>
16. Hitchcock SA. Blood-brain barrier permeability considerations for CNS-targeted compound library design [Internet]. Vol. 12, *Current Opinion in Chemical Biology.* Curr Opin Chem Biol; 2008 [cited 2021 Jun 12]. p. 318–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18435937/>
17. Ramaswamy P, Goswami K, Dalavaikodihalli Nanjaiah N, Srinivas D, Prasad C. TNF- α

mediated MEK–ERK signaling in invasion with putative network involving NF- κ B and STAT-6: a new perspective in glioma. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jun 12];43(11):1257–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30839135/>

18. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: Implications for therapy [Internet]. Vol. 168, *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell; 2013 [cited 2021 Jun 12]. p. 591–606. Available from: [/pmc/articles/PMC3579281/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/257281/)

19. Seystahl K, Papachristodoulou A, Burghardt I, Schneider H, Hasenbach K, Janicot M, et al. Biological role and therapeutic targeting of TGF- β 3 in glioblastoma. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Jun 12];16(6):1177–86. Available from: www.aacrjournals.org

20. Zhang Z, Huang X, Li J, Fan H, Yang F, Zhang R, et al. Interleukin 10 promotes growth and invasion of glioma cells by up-regulating KPNA 2 in vitro. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Jun 12];15(4):927–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31436254/>

21. Ott M, Tomaszowski KH, Marisetty A, Kong LY, Wei J, Duna M, et al. Profiling of patients with glioma reveals the dominant immunosuppressive axis is refractory to immune function restoration. *JCI Insight*. 2020;5(17):1–17.

22. Jin K, Mao C, Chen L, Wang L, Liu Y, Yuan J. Review adenosinergic pathway: A hope in the immunotherapy of glioblastoma [Internet]. Vol. 13, *Cancers*. MDPI AG; 2021 [cited 2021 Jun 12]. p. 1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33435205/>

23. Goswami S, Walle T, Cornish AE, Basu S, Fernandez I, Vence L, et al. James Allison-HHS Public Access. 2020;26(1):39–46.

24. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment [Internet]. Vol. 18, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 Jun 12]. p. 601–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30006588/>

25. Allard B, Turcotte M, Stagg J. CD73-generated adenosine: Orchestrating the tumor stroma interplay to promote cancer growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.

26. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* [Internet]. 2010 Oct 14 [cited 2021 Jun 12];467(7317):863–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20944749/>

27. Burnstock G. Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci - Elit* [Internet]. 2011 Jan 6 [cited 2021 Jun 12];3 E(3):896–900. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622101/>

28. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system [Internet]. Vol. 16, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Jun 12]. p. 177–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922909/>
29. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MWL, Darcy PK, et al. CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis. Cancer Res [Internet]. 2011 Apr 15 [cited 2018 Nov 28];71(8):2892–900. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292811>
30. Young A, Mittal D, Stagg J, Smyth MJ. Targeting cancer-derived adenosine: New therapeutic approaches [Internet]. Vol. 4, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2014 [cited 2021 Jun 12]. p. 879–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035124/>
31. Zhu W, Zhou L, Qian JQ, Qiu TZ, Shu YQ, Liu P. Temozolomide for treatment of brain metastases: A review of 21 clinical trials. World Journal of Clinical Oncology. 2014.
32. Monteiro I, Vigano S, Faouzi M, Treilleux I, Ménétrier-caux C, Caux C, et al. CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. 2018;9(42):26659–69.
33. Xu Z, Gu C, Yao X, Guo W, Wang H, Lin T, et al. CD73 promotes tumor metastasis by modulating RICS/RhoA signaling and EMT in gastric cancer. Cell Death Dis [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Jun 12];11(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32205841/>
34. Jeong YM, Cho H, Kim TM, Kim Y, Jeon S, Bychkov A, et al. CD73 overexpression promotes progression and recurrence of papillary thyroid carcinoma. Cancers (Basel) [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Jun 12];12(10):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33086655/>
35. Ferretti E, Horenstein AL, Canzonetta C, Costa F, Morandi F. Canonical and non canonical adenosinergic pathways [Internet]. Vol. 205, Immunology Letters. Elsevier B.V.; 2019 [cited 2021 Jun 12]. p. 25–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29550257/>
36. Azambuja JH, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, Fernandes MC, Figueiró F. CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. 2018;
37. Azambuja JH, Schuh RS, Michels LR, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, et al. Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as CD73-siRNA Delivery System for Glioblastoma Treatment: a New Therapeutical Approach. Mol Neurobiol. 2020;
38. Ludwig N, Yerneni SS, Azambuja JH, Gillespie DG, Menshikova E V., Jackson EK, et al. Tumor-derived exosomes promote angiogenesis via adenosine A2B receptor signaling.

- Angiogenesis [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Jun 12];23(4):599–610. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09728-8>
39. Azambuja JH, Ludwig N, Yerneni S, Rao A, Braganhol E, Whiteside TL. Molecular profiles and immunomodulatory activities of glioblastoma-derived exosomes. *Neuro-Oncology Adv* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Jun 12];2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32642708/>
40. Zisakis A, Piperi C, Themistocleous MS, Korkolopoulou P, Boviatsis EI, Sakas DE, et al. Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients. *Cytokine* [Internet]. 2007 Aug 13 [cited 2021 Jun 12];39(2):99–105. Available from: <https://europepmc.org/article/med/17697783>
41. Vasco C, Canazza A, Rizzo A, Mossa A, Corsini E, Silvani A, et al. Circulating T regulatory cells migration and phenotype in glioblastoma patients: An in vitro study. *J Neurooncol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 Jun 12];115(3):353–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24005771/>
42. Alban TJ, Alvarado AG, Sorensen MD, Bayik D, Volovetz J, Serbinowski E, et al. Global immune fingerprinting in glioblastoma patient peripheral blood reveals immune suppression signatures associated with prognosis. *JCI insight* [Internet]. 2018 Nov 2 [cited 2021 Jun 12];3(21). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3038746/>
43. Quezada C, Garrido W, Oyarzun C, Fernandez K, Segura R, Melo R, et al. 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *J Cell Physiol*. 2013;
44. Antonioli L, Yegutkin GG, Pacher P, Blandizzi C, Haskó G. Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities. *Trends in Cancer*. 2016.
45. Bertoni APS, de Campos RP, Tamajusuku ASK, Stefani GP, Braganhol E, Battastini AMO, et al. Biochemical analysis of ectonucleotidases on primary rat vascular smooth muscle cells and in silico investigation of their role in vascular diseases. Vol. 256, *Life Sciences*. 2020.
46. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*. 1986;157(2):375–80.
47. Bennett S, Breit SN. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV [Internet]. Vol. 56, *Journal of Leukocyte Biology*. Federation of American Societies for Experimental Biology; 1994 [cited 2021 Jun 12]. p. 236–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8083595/>

Projeto: Avaliação da resposta de células imunes frente ao câncer colorretal e formação de metástases

Coordenadora: Profa Dra Elizandra Braganhol

Resumo

Estudos indicam que a participação de um microambiente inflamatório é essencial para a progressão tumoral e possivelmente para o desenvolvimento de metástases. No contexto do câncer, os macrófagos associados ao tumor (TAM) frequentemente apresentam uma polarização do *tipo*-M2, a qual desempenha importantes funções de promoção tumoral. Assim, o presente estudo torna-se relevante devido à alta incidência e prevalência do câncer colorretal (CCR) no mundo, do qual a metástase é a principal causa de morte. **Objetivo:** Analisar o fenótipo dos TAM presentes no microambiente do CCR, com foco no seu papel na progressão tumoral e formação de metástases.

Metodologia: culturas primárias de macrófagos humanos serão obtidas a partir da diferenciação de monócitos circulantes. Tais culturas serão co-cultivadas com células de linhagem de CCR humano. Macrófagos cultivados isoladamente serão considerados controle. A avaliação dos fenótipos M1/M2 dos macrófagos será realizada por citometria de fluxo (FACS) para os marcadores CD204, CD163 e HLA-DR ou por qPCR utilizando primers específicos para os seguintes alvos: iNOS, Arginase-1, FIZZ1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β . Em um segundo bloco de experimentos, a polarização dos macrófagos será analisada a partir de biópsias de CCR obtidas de pacientes por meio de procedimento cirúrgico. Os macrófagos serão isolados das amostras de tumor e da borda livre de tumor utilizando o gradiente de Ficoll e a polarização dos mesmos será determinada por FACS, conforme descrito acima. **Resultados:** A expectativa é contribuir para um melhor entendimento das bases celulares e moleculares relacionados à progressão tumoral, mais especificamente da participação dos macrófagos, focando na identificação de novos alvos de possível intervenção terapêutica.

Palavras-chave: Câncer colorretal (CCR); macrófagos associados ao tumor (TAM); metástases.

Justificativa

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais incidente e prevalente em todo o mundo. No Brasil, o CCR é o segundo tipo de câncer mais comum, segundo estimativa de 2020. Apesar de muitas evidências conectarem câncer e inflamação, a participação das células do sistema imune inato, mais especificamente dos macrófagos, no processo de malignidade e formação de metástases do CCR ainda é pouco conhecida. Considerando que as células tumorais moldam o comportamento dos macrófagos a contribuir para o crescimento tumoral, possivelmente existem mecanismos ainda não conhecidos que geram esse ambiente enriquecido em fatores imunossupressores, resultando na sobrevivência tumoral. A liberação desses fatores para a circulação por sua vez, pode vir a modular o

fenótipo das células imunes circulantes, as quais favorecem a formação do nicho pré-metastático no tecido-alvo. A elucidação dessas vias pode ser importante para melhor compreender os mecanismos de progressão do CCR e a formação de metástases e, assim, criar estratégias terapêuticas para contornar esse grave problema no manejo clínico desses pacientes.

Introdução

O câncer colorretal (CCR) é definido como tumores que se desenvolvem no cólon e no reto (INCA, 2018). Geralmente esses tumores têm início com pólipos, lesões benignas que se desenvolvem na parede interna do intestino. Na maioria das vezes, quando detectado em estágio precoce é curável, entretanto quando não tratado, pode se espalhar para outros órgãos e se tornar fatal (INCA, 2018). A metástase é a principal causa de morte, cerca de 20% dos pacientes possuem metástase no fígado no momento do diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2014). Entre o aparecimento do pólio adenomatoso e a transformação em tumor estima-se um período superior a 10 anos (BYE et al., 2017; HABR-GAMA, 2005). Dados da literatura mostram que o sistema imunológico participa na patogênese do CCR, tanto que pacientes acometidos com doenças inflamatórias intestinais apresentam maior risco do desenvolvimento do tumor (BALKWILL; MANTOVANI, 2012; GUPTA et al., 2007; ITZKOWITZ; HARPAZ, 2004; ITZKOWITZ; YIO, 2004; RUTTER et al., 2004).

Conjuntamente às funções das células imunes no microambiente tumoral (TME), existem alterações no sistema purinérgico. Moléculas como ATP e adenosina, em níveis patológicos, favorecem a anergia do sistema imune no combate a essa malignidade, levando a progressão tumoral (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013). Sendo assim, investigar a relação do sistema inflamatório e a participação do sistema purinérgico no desenvolvimento de metástase no CCR se mostra necessário, para que futuramente possam ser desenvolvidas terapias alvo direcionadas mais eficientes no combate ao CCR metastático (CCR m).

Classificação dos CCRs

Conforme a sétima edição do Manual de estadiamento do câncer da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), os cânceres do cólon e do reto são classificados por grupos de estágios, sendo eles 0, I, II, III, IVA e IVB, nos quais se inserem as características de estadiamento TNM (AJCC, 2010), como mostra o anexo I (Tabela 1). Onde T é referente a profundidade de invasão do tumor para dentro ou além da parede colorretal, invasão a órgãos ou estruturas adjacentes; N ao número de linfonodos regionais envolvidos; e M a presença ou ausência de metástases distantes, como mostra o anexo I (Tabela 2) (AJCC, 2010).

Metástases

Atualmente, a sobrevivência global média para pacientes com CCRm é de aproximadamente 30 meses (VAN CUTSEM et al, 2016). Cerca de 50% dos pacientes que apresentam CCR primário acabarão sendo diagnosticados com doença metastática (ATREYA et al, 2017). É extremamente importante conhecer o processo que dá origem à metástase, porque 95% das mortes por tumores sólidos no mundo são causadas por esse fenômeno (NOY e POLLARD, 2014).

No CCRm, as células tumorais circulantes predominam no fígado, devido ao sistema da veia porta que liga o cólon e o reto ao fígado. Para finalizar o processo é necessário o bom estabelecimento dos novos focos metastáticos, o que depende da proliferação tumoral e da adaptabilidade ao novo ambiente (WANG et al, 2017).

Tratamento do CCR

A ressecção cirúrgica é a terapia primária para CCR não metastático (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2014). Já o tratamento para o CCRm tem sido a quimioterapia sistêmica com o 5-fluorouracil (5-FU), cujo o mecanismo de ação é a inserção errônea de fluoronucleotídeos no DNA e RNA, inibindo a biossíntese desses (CREMOLINI et al, 2015; WEINBERG et al, 2016).

Processo inflamatório no CCR

Os macrófagos possuem um espectro de ativação, onde a polarização M1/clássica (pró-inflamatória) pode ser induzida por citocinas como o interferon- γ (IFN- γ) ou fator de necrose tumoral (TNF), sozinhos ou em conjunto com produtos microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS) (MANTOVANI et al, 2004). O fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) é um novo estímulo adicionado à categoria M1 (VERRECK et al, 2004). Tal população de células é caracterizada por: alta capacidade de apresentar antígeno; produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-12 (IL-12), IL-6, IL-8, TNF, IL-1 β e IL-23; alta produção de intermediários tóxicos, como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROS) (MANTOVANI et al, 2004, MARTINEZ e GORDON, 2014). Os macrófagos M1 participam do recrutamento de células Th1, Tc1 e NK, coordenando uma resposta imune tipo I ou clássica, que tem função de ataque a patógenos intracelulares e resistência tumoral.

Por outro lado, a polarização M2/alternativa (anti-inflamatória) é induzida pela IL-4, que é produzida pelas células Th2, eosinófilos, basófilos ou os próprios macrófagos (MARTINEZ e GORDON, 2014). Esse fenótipo é associado com diminuição da fagocitose, aumento da atividade da arginase, aumento da expressão de receptores de manose, aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (MARTINEZ e GORDON, 2014), inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias

(FIORENTINO et al, 1989), além disso, promove o recrutamento de células imunes como eosinófilos, basófilos, células Th2, Tregs e T virgens, e imunorregulação, pela produção de agonista de CCR3, CCR4, CCR8 e das citocinas CCL1, CCL16 e CCL18 (MANTOVANI et al, 2004).

Macrófagos associados ao tumor (TAM)

No início do processo tumoral os macrófagos são recrutados, na sequência, as células tumorais os corrompe para que tenham um comportamento pró-tumoral, passando a atuar como macrófagos-associados ao tumor (TAM) (POLLARD, 2004; QIAN e POLLARD, 2010; BALKWILL e MANTOVANI, 2012). Os TAM podem apresentar características mistas de polarização M1 e M2, entretanto, com comportamento predominantemente imunossupressivo (QIAN e POLLARD, 2010). O microambiente é tomado por citocinas e fatores de crescimento que geram a diminuição da resposta imune inflamatória Th1 para gerar uma região anti-inflamatória, tipo Th2 (NOY e POLLARD, 2014). Os mecanismos pró-tumorais no microambiente ofertado pelos TAM são a criação de vasculatura e a promoção de invasão, beneficiando a formação de metástases (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; WYCKOFF et al, 2007). Na sequência, ocorre imunossupressão, que também envolve células Treg, bem como a evasão imune mediada por células tumorais (COUSSENS e POLLARD, 2010; GAJEWSKI et al, 2013; MOVAHEDI et al., 2010). Além disso, os TAM expressam IL-10 e TGF- β , citocinas envolvidas na modulação das funções das células T, onde o TGF- β inibe as funções citotóxicas, enquanto a IL-10 inibe as funções auxiliares (OH e LI, 2013; NG et al., 2013; BROWN et al., 2004).

Sistema Purinérgico: papel na tumorigênese e na regulação do processo imune/inflamatório

Muitos tipos de células liberam ATP fisiologicamente, que atua como sinalizador via sensibilização de purinoreceptores (BURNSTOCK, 1978; BODIN & BURNSTOCK, 2001; BURNSTOCK & DI VIRGILIO, 2013). Quando se encontra extracelularmente, o ATP é hidrolisado por enzimas chamadas de ectonucleotidases, como as ENTPDases, onde temos a NTPDase1/CD39, que degrada o ATP em adenosina 5'-difosfato (ADP) e posteriormente em adenosina monofosfato (AMP); e a CD73/ecto-5'-nucleotidase que converte o AMP em adenosina. Os receptores para nucleotídeos extracelulares e seus produtos de degradação, como a adenosina, são caracterizados da seguinte maneira: uma divisão dos receptores purinérgicos entre P1 (adenosina) e P2 (ATP, ADP) e uma subdivisão dos receptores P2 entre P2Y e P2X, cujo os receptores P2Y são acoplados à proteína G (metabotrópicos), enquanto os receptores P2X são canais iônicos (BURNSTOCK, 1978; BURNSTOCK & KENNEDY, 1985; BURNSTOCK, 2014).

No câncer, é notável a expressão aumentada de ecto-5'nucleotidase (CD73), enzima que cataboliza AMP a adenosina, sendo que a última auxilia no início e na progressão tumoral por gerar

um microambiente imunossupressor e angiogênico. Além disso, também participa da formação de metástases (ANTONIOLI L. et al., 2013; YEGUTKIN, G.G., 2014; ANTONIOLI, L. et al., 2013; ALLARD, B. et al., 2016; ALLARD, B. et al., 2014). Já o ATP está relacionado ao recrutamento de monócitos aos sítios alvos e a estimulação dos macrófagos a produzir mediadores inflamatórios (VENTURA et al, 1995; INOUE, 2008).

Objetivos

Objetivo geral

Investigar a participação do sistema imune na progressão do câncer colorretal e na formação de metástases.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1. Analisar a densidade de TAM em biópsias tumorais e na borda livre de tumor.

Objetivo específico 2. Investigar a polarização de cultura primária de macrófagos humanos frente a exposição ao soro de indivíduos saudáveis ou de pacientes diagnosticados com CCR ou com tumor metastático.

Objetivo específico 3. Investigar a polarização de cultura primária de macrófagos humanos co-cultivadas com células tumorais de CCR.

Objetivo específico 4. Analisar parâmetros de sinalização purinérgica *in vitro* de macrófagos expostos ao soro de indivíduos saudáveis ou de pacientes diagnosticados com CCR ou com tumor metastático ou co-cultivados com as células tumorais.

Objetivo específico 5. Investigar os níveis séricos de ATP e de seus metabólitos, particularmente a adenosina, em soro de indivíduos saudáveis ou de pacientes diagnosticados com CCR ou com tumor metastático.

Objetivo específico 6. Correlacionar os dados obtidos a partir da análise das biópsias tumorais e das culturas de células imunes com os dados clínicos do paciente (grau de malignidade tumoral; resposta à quimioterapia; formação de metástases).

Hipótese de estudo

O processo inflamatório e a formação de metástases de CCR

Nós hipotetizamos que a comunicação entre as células tumorais e as células do sistema imune inato, gerando macrófagos “educados” a favorecerem o tumor, poderiam ter como principais consequências: (1) a produção de um ambiente enriquecido em fatores imunossupressores, como a adenosina, a qual poderia neutralizar o ataque ao tumor pelos linfócitos T citotóxicos ou pelas NK (natural killer),

resultando em sobrevivência tumoral e (2) a liberação de fatores imunossupressores para a circulação, modulando o fenótipo/polarização das células imunes as quais, por sua vez, favoreceriam a formação de um nicho pré-metastático em tecidos-alvo. A elucidação dessas vias é importante para melhor compreender os mecanismos de progressão do CCR e a formação de metástases e, assim, criar estratégias terapêuticas para contornar esse grave problema no manejo clínico desses pacientes.

Metodologia

Aspectos Éticos: Serão respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução Resolução Nº 674 de 06 de maio de 2022. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP do Grupo Hospitalar Santa Casa (parecer 3.434.086).

Crítérios de inclusão e de exclusão: Serão incluídos no estudo pacientes do Grupo Hospitalar Santa Casa com diagnóstico de câncer primário no segmento do cólon, com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos; submetidos a cirurgia para remoção do tumor; no grupo controle serão incluídos pessoas de Porto Alegre e região metropolitana, sem diagnóstico ou histórico de qualquer tipo de câncer, com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos. Serão excluídos os pacientes com infecções por vírus crônicos, incluindo HBV, HCV e HIV.

Coleta de biópsias de CCR: O procedimento cirúrgico será conduzido de forma habitual. Serão coletadas amostras tumorais e tecido adjacente livre de tumor. As biópsias que serão utilizadas nesse projeto serão armazenadas em **(a)** tampão PBS que tem como finalidade proteger o tecido tumoral/adjacente ao tumor e manter a integridade celular para a extração de TAM ou para a realização do cultivo primário de tecido tumoral; **(b)** RNeasy® amostras que serão utilizadas para as análises de qPCR. As amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Cultivo Celular da UFCSPA para a realização das análises. Os dados clínicos dos pacientes serão coletados pelos seus médicos responsáveis ao longo do tratamento. As espécimes ressecadas serão patologicamente classificadas de acordo com a sétima edição da classificação de tumores malignos UICC TNM.

Coleta de sangue: amostras de sangue dos pacientes diagnosticados com CCR primário ou com metástase e dos indivíduos controles serão coletadas por punção venosa em tubo vacutainer sem anticoagulante. O soro será obtido por centrifugação e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

Cultura de linhagem de células Caco-2: As células serão mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com fungisona, estreptomicina e penicilina, com 20% de soro fetal bovino (SFB) em incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂

Obtenção dos macrófagos associados ao tumor: Serão isolados utilizando um kit de centrifugação de gradiente de densidade Percoll seguindo as instruções do fabricante, conforme previamente descrito com menores modificações (Chen, 2016).

Cultura primária de macrófagos: Os monócitos serão isolados utilizando o gradiente de Ficoll-Histopaque 1077, após a obtenção do sangue de cordão (protocolo adaptado de Parisi, 2014). Para os experimentos de análise de polarização de macrófagos, as culturas serão expostas ao meio de cultivo RPMI suplementado com 10% de soro humano oriundo de indivíduos saudáveis ou de pacientes diagnosticados com CCR primário ou CCR metastático durante 24 ou 48 h.

Cultura primária de células tumorais isoladas de biópsias: As amostras serão cortadas em pequenos fragmentos, as células tumorais serão obtidas com adição da enzima liberase, serão filtradas, o pellet será ressuspensionado em RPMI incompleto (protocolo adaptado de Souza, 2014).

PCR em tempo real (qPCR): O RNA total será extraído a partir das amostras utilizando kit específico e o cDNA será sintetizado pela reação da transcriptase reversa seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA sintetizado será utilizado como molde para as reações de qPCR utilizando primers específicos.

Citometria de fluxo (FACS): quantificação da expressão de HLA-DR, CD163, CD206, CD209 e CD11b para monócitos humanos baseado na imunodeteção com anticorpo secundário marcado com fluorescência. As citocinas séricas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β serão determinadas utilizando kit CBA, seguindo as recomendações do fabricante.

Cálculo do tamanho da amostra: O cálculo do tamanho amostral foi realizado com o auxílio do serviço de estatística da UFCSPA considerando um erro α de 0.05 e um poder $(1 - \beta)$ 0.90 e o valor de “N” estimado foi de 50 pacientes e 50 indivíduos pareados por sexo e idade que serão utilizados como controle para as análises realizadas em soro. Para a realização das culturas primárias de macrófagos humanos, o “N” estimado foi de 10 indivíduos, utilizando os mesmos critérios estatísticos.

Análise estatística: Os dados serão analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste múltiplo de Duncan quando indicado (software SPSS).

Resultados esperados

A expectativa é que as descobertas acerca do papel dos TAM na formação de metástase no CCR possam contribuir para a geração de conhecimento dos mecanismos envolvidos nesse processo e na identificação de possíveis alvos de intervenção. Utilizando as abordagens de cultivo celular e de análise de amostras de pacientes, a expectativa é que macrófagos que apresentam um fenótipo imunossupressor do *tipo*-M2 favoreçam a progressão tumoral e a formação de metástases. Além

disso, essa proposta apresenta uma visão translacional, uma vez que busca correlacionar os dados de polarização de macrófagos com os dados clínicos dos pacientes.

Produtos

Espera-se formar recursos humanos em nível de excelência na área de imunooncologia com caráter de pesquisa translacional, associando a esse projeto, além do doutorando, alunos de iniciação científica e médicos oncologistas e cirurgiões. Através dos resultados obtidos pretende-se publicar no mínimo dois (02) artigos de elevado impacto em periódico internacional e apresentações em congressos científicos na área.

Cronograma

Ano 2022 - 2023		
Semestre	2022/2	2023/1
Revisão de literatura	X	X
Coleta biópsia e sangue	X	X
Isolamento monócitos		X
Identificação do fenótipo M1/M2 nas amostras tumorais		X
Ano 2023-2024		
Semestre	2023/2	2024/1
Revisão da literatura	X	X
Estabelecimento do cultivo de células primárias	X	
Exposição de macrófagos primários ao soro coletado	X	X
Ano 2024-2025		
Semestre	2024/2	2025/1
Revisão de literatura	X	X
Co-cultivo de macrófagos com células de linhagem de CCR	X	
Investigação da polarização das células imunes co-cultivadas	X	X
Ano 2025-2026		
Semestre	2025/2	2026/1
Revisão de literatura	X	X
Análise da expressão de receptores purinérgicos nas células imunes	X	X
Ano 2026		
Semestre	2026/2	
Revisão da literatura	X	
Análise dos níveis de ATP nas amostras de soro coletado	X	
Associação dos dados clínicos com os resultados das biópsias e do soro	X	

Orçamento

Materiais de consumo	Valor:
Meios, suplementos, fatores de crescimento e antibióticos para cultivo.	R\$ 9.000,00
Placas e garrafas de plásticos para o cultivo das células.	R\$ 6.000,00
Tampões, sais, ácidos, bases, corantes e anticorpos.	R\$ 15.000,00

Materiais para coleta das amostras	R\$ 500,00
Total:	R\$ 30.500,00

Referências:

- POLLARD, Jeffrey W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 1, p. 71, 2004.
- DENARDO, David G. et al. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell*, v. 16, n. 2, p. 91-102, 2009.
- SHAND, Francis HW et al. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 21, p. 7771-7776, 2014.
- BALKWILL, Frances R.; MANTOVANI, Alberto. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2012. p. 33-40.
- QIAN, Bin-Zhi; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, v. 141, n. 1, p. 39-51, 2010.
- WANG, Dongxu et al. The role of microRNAs in colorectal liver metastasis: Important participants and potential clinical significances. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, p. 1010428317709640, 2017.
- ULLMAN, Thomas A.; ITZKOWITZ, Steven H. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, v. 140, n. 6, p. 1807-1816. e1, 2011.
- JESS, Tine; RUNGOE, Christine; PEYRIN-BIROULET, Laurent. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 10, n. 6, p. 639-645, 2012.
- BYE, William A. et al. Strategies for detecting colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. *The Cochrane Library*, 2017.
- ATREYA, C. E.; YAEGER, R.; CHU, E. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: From Current Standards to Future Molecular Targeted Approaches. In: *AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY EDUCATIONAL BOOK*. American Society of Clinical Oncology. Meeting. 2017. p. 246-256.
- AUNE, Dagfinn et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Bmj*, v. 343, p. d6617, 2011.
- ITZKOWITZ, Steven H.; YIO, Xianyang. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **American Journal of PhysiologyGastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 1, p. G7-G17, 2004.

USHER-SMITH, Juliet A. et al. Risk prediction models for colorectal cancer: a systematic review. *Cancer prevention research*, p. canprevres. 0274.2015, 2015.

TRIANATFILLIDIS, John K.; NASIOULAS, Georgios; KOSMIDIS, Paris A. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. **Anticancer research**, v. 29, n. 7, p. 2727-2737, 2009.

MUGHINI-GRAS, Lapo et al. Increased colon cancer risk after severe Salmonella infection. **PloSone**, v. 13, n. 1, p. e0189721, 2018.

FEDIRKO, V. et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology*, v. 22, n. 9, p. 1958-1972, 2011.

STEWART BW WC. World Cancer Report 2014: Publicações do IARC, Organização Mundial da Saúde (OMS); 2014.

TAKANO, Yuki et al. Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 8, n. 45, p. 78598, 2017.

M. Ervik, F. Lam, J. Ferlay, L. Mery, I. Soerjomataram, F. Bray (2016). *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today*. Available from: <http://gco.iarc.fr/today> <http://gco.iarc.fr/today>, accessed [19/02/2018]

LIMSUI, David et al. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 102, n. 14, p. 1012-1022, 2010.

VAN CUTSEM, Eric et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1386-1422, 2016.

GALDIERO, Maria Rosaria et al. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *Journal of leukocyte biology*, 2017.

MARTINEZ, Fernando O.; GORDON, Siamon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, v. 6, 2014.

MANTOVANI, Alberto et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.

NOY, Roy; POLLARD, Jeffrey W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 49-61, 2014.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

BALKWILL, Frances; CHARLES, Kellie A.; MANTOVANI, Alberto. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*, v. 7, n. 3, p. 211-217, 2005.

BROWN, E. R. et al. A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF- α inhibitor, in patients with advanced cancer. *Annals of oncology*, v. 19, n. 7, p. 1340-1346, 2008.

WU P, Wu D, Ni C, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*. 2014;40(5):785–800.

ERUSLANOV EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5466–5480.

HOUGHTON AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med*. 2010;16(2):219–223.

KEMP TJ, Ludwig AT, Earel JK, et al. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood*. 2005;106(10):3474–3482.

TANAKA H, Ito T, Kyo T, Kimura A. Treatment with IFN α in vivo up-regulates serum-soluble TNF-related apoptosis inducing ligand (sTRAIL) levels and TRAIL mRNA expressions in neutrophils in chronic myelogenous leukemia patients. *Eur J Haematol*. 2007;78(5):389–398.

TECCHIO C, Huber V, Scapini P, et al. IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*. 2004;103(10):3837–3844.

PICCARD H.; Muschel R.J.; Opdenakker G. (2012). On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 82 296–309.

VINETTE, Valérie et al. Multidrug resistance-associated protein 2 expression is upregulated by adenosine 5'-triphosphate in colorectal cancer cells and enhances their survival to chemotherapeutic drugs. *PloSone*, v. 10, n. 8, p. e0136080, 2015.

QIAN, Fei et al. High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer. *Human pathology*, v. 64, p. 61-68, 2017.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling: past, present and future. **Braz J Med Biol Res**. v.42, n.1, p.3-8. 2009.

BURNSTOCK, Geoffrey; BOEYNAEMS, Jean-Marie. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic signalling**, v. 10, n. 4, p. 529-564, 2014.

PARK, Jin-Hee et al. Potent suppressive effects of 1-piperidinylimidazole based novel P2X7 receptor antagonists on cancer cell migration and invasion. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 16, p. 7410-7430, 2016.

IDZKO, Marco et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. **Nature medicine**, v. 13, n. 8, p. 913, 2007.

DI VIRGILIO, Francesco; BOEYNAEMS, Jean-Marie; ROBSON, Simon C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 507-513, 2009.

ELLIOTT, Michael R. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 282, 2009.

HOMOLYA, László; STEINBERG, Thomas H.; BOUCHER, Richard C. Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 6, p. 1349-1360, 2000.

MCNAMARA, Nancy et al. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9086-9091, 2001.

SÉROR, Claire et al. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 9, p. 1823-1834, 2011.

RALEVIC Vera; BURNSTOCK G.. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* September, 50 (3) 413-492, 1998.

ABBRACCHIO, Maria P.; BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 113-145, 1998.

BODIN, Philippe; BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochemical research**, v. 26, n. 8-9, p. 959-969, 2001.

GENDRON, Fernand-Pierre; PLACET, Morgane; ARGUIN, Guillaume. P2Y2 Receptor Functions in Cancer: A Perspective in the Context of Colorectal Cancer. 2017.

INCA. Colorretal, Tipos de Câncer. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definição] Acesso em: 18/04/2018.

American Joint Committee on Cancer • 2010 Disponível em: [https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%207th%20Ed%20Cancer%20Staging%20Manual.pdf]

Acesso em: 25/04/2018

HABR-GAMA, Angelita. Câncer colorretal: a importância de sua prevenção. **Arqgastroenterol**, v. 42, n. 1, p. 2-3, 2005.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

BALKWILL, Frances R.; MANTOVANI, Alberto. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2012. p. 33-40.

GUPTA, RoopaliBansal et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1099-1105, 2007.

ITZKOWITZ, Steven H.; HARPAZ, Noam. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1634-1648, 2004.

RUTTER, Matthew et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 126, n. 2, p. 451-459, 2004.

CREMOLINI, Chiara et al. First-line chemotherapy for mCRC—a review and evidence-based algorithm. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 607, 2015.

WEINBERG, Benjamin A. et al. A paradigm shift from one-size-fits-all to tailor-made therapy for metastatic colorectal cancer. **ClinAdvHematolOncol**, v. 14, n. 2, p. 116-128, 2016.

VERRECK, Frank AW et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4560-4565, 2004.

FIORENTINO, David F.; BOND, Martha W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, 1989.

OH, Hana; SIANO, Brian; DIAMOND, Scott. Neutrophil isolation protocol. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 17, 2008.

OH, Soyoung A.; LI, Ming O. TGF- β : guardian of T cell function. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 8, p. 3973-3979, 2013.

PARISI, Mariana Migliorini. Padronização de técnica de purificação de monócitos como modelo de cultura celular para estudo da diferenciação in vitro de macrófagos. Dissertação de Mestrado, 2014. Disponível em: [<http://hdl.handle.net/10183/103310>]. Acesso em: 19/06/2018

CASSETTA, Luca et al. Isolation of mouse and human tumor-associated macrophages. In: **Tumor Microenvironment**. Springer, Cham, 2016. p. 211-229.

ALLAM, Atef et al. Isolation of human lymphocytes with high yield and viability from the gastrointestinal and female reproductive tract of a humanized DRAG mouse. **Journal of immunological methods**, 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

COUSSENS, Lisa M.; POLLARD, Jeffrey W. Leukocytes in mammary development and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a003285, 2010.

GAJEWSKI, Thomas F.; SCHREIBER, Hans; FU, Yang-Xin. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014, 2013.

MOVAHEDI, Kiavash et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes. **Cancer Research**, p. 0008-5472. CAN-09-4672, 2010.

WYCKOFF, Jeffrey B. et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2649-2656, 2007.

BROWN, D.; TROWSDALE, J.; ALLEN, R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. **Tissue antigens**, v. 64, n. 3, p. 215-225, 2004.

NG, T. H. et al. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 129, 2013.

GRANOT, Zvi; JABLONSKA, Jadwiga. Distinct functions of neutrophil in cancer and its regulation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

GÜNGÖR, Nejla et al. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 149-154, 2009.

GROßE-STEFFEN, Thomas et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic tumor cell lines: the role of neutrophils and neutrophil-derived elastase. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

CASSATELLA, Marco A. On the production of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 6, p. 1140-1149, 2006.

HEWISH, Madeleine et al. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 4, p. 197, 2010.

BURNSTOCK, Geoffrey; DI VIRGILIO, Francesco. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 4, p. 491-540, 2013.

CHEN, Wankun et al. MFHAS1 promotes colorectal cancer progress by regulating polarization of tumor-associated macrophages via STAT6 signaling pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, p. 78726, 2016.

Anexo I

Tabela 1: Estadiamento TNM para câncer colorretal

Estágio	T	N	M
0	<i>T in situ</i>	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N1	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b

Tabela 2. Definição de TNM

Tumor primário (T)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
T <i>in situ</i>	Carcinoma in situ: intraepitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria em tecidos pericólicas
T4a	Tumor penetra na superfície do peritônio visceral
T4b	Tumor invade diretamente ou é aderente a outros órgãos ou estruturas

Linfonodo Regional (N)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase linfonodal regional
N1	Metástase em 1-3 gânglios linfáticos regionais
N1a	Metástase em um linfonodo regional
N1b	Metástase em 2-3 linfonodos regionais
N1c	Depósito de tumor na subserosa, mesentério ou tecidos pericólicos ou perirretais não peritoneais sem metástase nodal regional
N2	Metástase em quatro ou mais linfonodos regionais

N2a	Metástase em 4-6 linfonodos regionais
N2b	Metástase em sete ou mais linfonodos regionais

Metástase distante (M)	
M0	Nenhuma metástase distante
M1	Metástase à distância
M1a	Metástase confinada a um órgão ou local
M1b	Metástases em mais de um órgão / local ou peritônio

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

THAMY SCHOSSLER RICHROT

AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O TEMPO DE
PERMANÊNCIA E MORTALIDADE DE PACIENTES COM SEPSE DE ORIGEM
ABDOMINAL EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Bordignon Nunes
CO-ORIENTADORES: Profa. Dra. Gisele Branchini e Prof. Dr. Jorge Amilton Höher

PORTO ALEGRE

2023/1

THAMY SCHOSSLER RICHROT

AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL SOBRE O TEMPO DE
PERMANÊNCIA E MORTALIDADE DE PACIENTES COM SEPSE DE ORIGEM
ABDOMINAL EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Projeto de pesquisa de mestrado apresentado
como requisito para a obtenção do título de
mestre em patologia

ORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Bordignon Nunes
CO-ORIENTADORES: Profa. Dra. Gisele Branchini e Prof. Dr. Dr. Jorge Amilton
Höher

PORTO ALEGRE

2023/1

SUMÁRIO

1. RESUMO
2. INTRODUÇÃO
3. JUSTIFICATIVA
4. OBJETIVOS
5. MATERIAL E MÉTODOS
6. ORÇAMENTO
7. CRONOGRAMA
8. REFERÊNCIAS

1. RESUMO

Introdução: A sepse é definida como uma disfunção orgânica do indivíduo, frente a uma reação metabólica desregulada ocasionada por uma infecção. Conforme a Organização Mundial da Saúde a incidência de óbito pela sepse abrange cerca de 11 milhões de pessoas, e 49% destes pacientes são internados em uma unidade de terapia intensiva. O processo para recuperação da homeostasia durante uma infecção depende de adenosina trifosfato (ATP), conhecido como moeda energética, que é sintetizado pelas mitocôndrias, porém a sepse induz lesão e disfunção dessas organelas, intensificando a degradação da massa mitocondrial e nos pacientes críticos, isso é ainda mais grave. O baixo aporte nutricional durante a sepse nestes pacientes também pode estar associado com alterações nas funções e estruturas das mitocôndrias, visto que sua massa está em constante biogênese necessitando de proteína, um macronutriente sintetizador de massa muscular e do carboidrato, uma das maiores fontes de ATP quando degradado até o piruvato. Levando isso em consideração, uma das formas para minimizar o catabolismo proteico e encontrar a homeostase metabólica é o fornecimento adequado do aporte nutricional.

Objetivos: Avaliar a influência do aporte nutricional no tratamento da sepse abdominal e a possível redução sobre a mortalidade e o tempo de internação de pacientes da UTI.

Métodos: Trata-se de um estudo observacional transversal prospectivo. A população será composta por pacientes internados em uma UTI do complexo hospitalar da Santa Casa admitidos entre outubro de 2023 a outubro de 2024 com um tamanho amostral de 238 pacientes. Serão incluídos pacientes com idade ≥ 18 anos, que tiverem diagnóstico de sepse abdominal até 48h após internação e que receberem terapia nutricional durante os primeiros 7 dias de internação. A coleta de dados será realizada através do prontuário eletrônico com o auxílio de uma ficha elaborada em formulário do *Google forms* e será feita a coleta de sangue no momento do diagnóstico da sepse abdominal, no 1º, 3º e 7º dia de terapia nutricional. As análises serão realizadas no pacote estatístico SPSS 22.0.

DECS: Sepse; Sepsis; terapia nutricional; Nutrition therapy; unidade de terapia intensiva; intensive care units; Critically ill patients; pacientes críticos; Mitochondrial activity; atividade mitocondrial.

2. INTRODUÇÃO

A sepse foi descrita pela primeira vez em 1991¹ e atualmente é definida como uma disfunção orgânica do indivíduo, frente a uma reação metabólica desregulada ocasionada por uma infecção². Cabe ressaltar que a inflamação se caracteriza por 7 sinais: rubor, dor, calor, inchaço, distúrbio funcional, acidose e hipoxemia^{3,4}, e quando está presente na sua forma mais grave – choque séptico – pode levar ao óbito^{2,5}. Em situações de diagnóstico, a ferramenta mais fidedigna utilizada até o momento para paciente em estágio grave é o *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)⁶.

Em 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS)⁷ publicou seu primeiro relatório global sobre a incidência de óbito pela sepse abrangendo cerca de 11 milhões de pessoas, sendo que 49% destes pacientes estavam internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI). Em 2021, o Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS)⁸ a partir de uma amostra de 12.458 mil pacientes internados em hospitais brasileiros, relatou que 16,2% dos indivíduos tiveram algum tipo de infecção na UTI, 25% em pronto socorro (necessitando de internação na UTI dentro de 24h), e 8% de pacientes na enfermaria. Ainda, uma meta-análise que incluiu 51 estudos buscou investigar a incidência global de sepse em adultos hospitalizados, evidenciando que 189 [95% CI 133 - 26] pacientes tiveram tratamento hospitalar para sepse dentro de um parâmetro de 100,000 pessoas/ano, 26,7% [22,9 – 30,7] dos pacientes com sepse foram a óbito e 41,9% [95% CI 36,2 - 47,7] morreram antes da alta hospitalar⁹. Evidenciando um quadro de disfunção orgânica grave em que mais que da metade dos pacientes não sobrevivem.

Ressalta-se que pacientes críticos com sepse encontra-se em um estado altamente catabólico, o que ocasiona a ativação da cascata inflamatória para combater as bactérias, patógenos ou vírus causadores da infecção^{10,11}. No primeiro momento, ocorre a liberação de alguns mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas no local da inflamação para iniciar a resposta da imunidade inata (composta por células mieloides e linfoides), após, são recrutados os leucócitos que irão aumentar a sinalização de anticorpos para gerar fagocitose e, consequente, inflamação tecidual, visando encontrar a estabilidade corpórea^{11,12}. O processo para recuperação da homeostasia depende de adenosina trifosfato (ATP) que é sintetizado pelas mitocôndrias, porém a sepse induz lesão e

disfunção dessas organelas, intensificando a degradação da massa mitocondrial e nos pacientes críticos isso é ainda mais grave^{10,11,13,14}.

Ademais, um estudo prospectivo de caso controle com 57 pacientes, alocados em grupos controle e sépticos internados na UTI, buscou investigar marcadores mitocôndrias de lesão e recuperação (biogênese mitocondrial) a partir do sangue periférico com células mononucleares em pacientes sépticos. Foi constatado que no primeiro dia de sepse houve redução dos transcritos genéticos da mitocôndria entre os grupos ($p < 0,05$) provando que mediadores sépticos desregulam a estrutura mitocondrial. Quando comparado o dia 1 com o dia 3 os níveis de mRNA aumentaram significativamente e o mesmo aconteceu com alguns genes no dia 5 ($p < 0,05$). No dia 1 o ácido desoxirribonucleico da mitocôndria (mtDNA) estava reduzido no grupo séptico quando comparado ao controle ($p < 0,05$) consistente com a indução de dano mitocondrial na sepse e possibilitando perda da massa mitocondrial. No dia 5 o mtDNA teve recuperação e estava significativamente aumentado comparado com o dia 1, consistente com a indução de biogênese mitocondrial. A partir disso, pode-se concluir que as mitocôndrias durante a sepse possuem modificação da sua estrutura e função, acarretando a redução da produção de ATP, consequente danos celulares e má sinalização das células imunológicas¹³.

Nesse contexto, a adequada estrutura das mitocôndrias é indispensável para que haja a síntese de ATP de forma regular para suprir as funções celulares durante o processo de estresse oxidativo^{10,11,14}. Por sua vez, o ATP que é o combustível energético celular mais importante, quando é pouco sintetizado no organismo, pode ocasionar morte celular e dependendo de seu déficit, pode levar a disfunções de órgãos vitais^{10,11,14}. Quando a disponibilidade energética está insuficiente as células imunes e demais funções do organismo não conseguem desenvolver sua função corretamente, o que sugere que a atividade das mitocôndrias na sepse poderia influenciar nos desfechos clínicos dos pacientes^{10,11,14}.

Atrelado a isso, o baixo aporte nutricional durante a sepse no paciente crítico também pode estar associado com alterações nas funções e estrutura das mitocôndrias, visto que sua massa está em constante biogênese necessitando de proteína (PTN) que é um macronutriente sintetizador de massa muscular, além disso também está envolvido na síntese de DNA, enzimas, células imunológicas, entre outros^{10,11,15}, e do carboidrato (CHO) que é uma das maiores fontes de ATP quando degradado até o piruvato, que é um mediador do ciclo de Krebs através da glicogenólise ou gliconeogênese^{10,11,13}. Em uma

situação de estresse oxidativo e/ ou instabilidade hemodinâmica em que o corpo recebe baixo ou nulo aporte nutricional, a ausência do fornecimento do principal substrato energético que é o CHO, intensificando o processo de catabolismo proteico, que acarretará a perda de massa magra e possível quadro de desnutrição^{10,11,16}. Vale ressaltar que a maioria dos pacientes críticos já chegam desnutridos no hospital, caracterizando um estado metabólico agudo já na admissão^{15,17,18}.

Um estudo de coorte retrospectivo incluiu 5.606 pacientes internados na UTI, destes 12,95% foram diagnosticados com desnutrição grave na admissão e o restante sem desnutrição grave ($p < 0,0065$). Os pacientes com desnutrição grave apresentaram maior tempo de permanência hospitalar (mediana 7; IQR 3-15; $p < 0,0001$), foram a óbito 231 pacientes com desnutrição grave e 702 pacientes sem desnutrição grave¹⁹. Comprovando que a desnutrição está atrelada com piores desfechos clínicos. Um estudo transversal retrospectivo com 92 pacientes internados na UTI constatou que 38% dos pacientes que internaram devido a sepse, 21,7% eram desnutridos e 69,6% tiveram terapia nutricional precoce (dentro de 48 horas). Constatou-se ainda que o tempo de permanência na UTI foi menor naqueles que receberam aporte pleno, quando comparado aos que ficaram em déficit nutricional (14 e 20 dias, respectivamente), porém não apresentou significância estatística ($p = 5,45$) e o tempo de permanência na UTI foi menor naqueles que receberam nutrição precoce quando comparado com os que não receberam, 13 e 21 dias respectivamente ($p = 0,010$)²⁰. Outro estudo com 116 pacientes internados em uma UTI constatou que 67,2% dos pacientes que receberam dieta precoce $< 48h$, tiveram índice menor de mortalidade, quando comparados com grupo sem dieta precoce (14,3% versus 32,4%, $p = 0,023$)²¹. Sendo assim, a nutrição pode ser um adjuvante no tratamento dos pacientes críticos.

Levando isso em consideração, uma das formas para minimizar o catabolismo proteico e encontrar a homeostase metabólica é o fornecimento adequado do aporte nutricional¹⁵. A terapia nutricional (TN) possibilita manter a integridade da barreira intestinal com redução da translocação bacteriana e redução do estado pró-inflamatório, além de manter o trofismo gastrointestinal e a integridade da composição de massa muscular^{15,20}. O aporte nutricional adequado e precoce (dentro das 24-48h de internação), conforme a gravidade e fase da doença (aguda ou crônica) é uma estratégia terapêutica proativa, já que nesse momento ocorre uma grande mobilização de energia para estimular a função imune e o reparo dos tecidos lesados^{11,15}, podendo estar associado a redução da

gravidade da sepse, de complicações metabólicas, tempo de permanência na UTI, bem como redução dos custos hospitalares^{15,16,17,20,21,22}. Vale ressaltar que uma estratégia efetiva para avaliar se o aporte proteico está adequado é a aferição do balanço nitrogenado²³ com a urina de 24h. Por esse motivo, a terapia nutricional tem como objetivo prevenir a deterioração do estado nutricional.

Um estudo piloto prospectivo buscou investigar o efeito de uma nutrição permissiva hipocalórica e nutrição enteral padrão na função gastrointestinal e nos desfechos na fase aguda da sepse. O estudo foi composto por 54 pacientes críticos com sepse, sendo evidenciado que o grupo que recebeu 100% do aporte nutricional, quando comparado ao grupo que recebeu 30%, apresentou maiores níveis de integridade da barreira intestinal e menores níveis de pré-albumina e interleucina-6 ($P < 0.05$)²². Sendo possível entender que, ao ofertar aporte nutricional com micronutrientes e macronutrientes essenciais, em específico a proteína, é possível reduzir o estado inflamatório e catabólico, observando-se a redução da concentração da pré-albumina e da interleucina-6. Outrossim, ressalta-se que ainda é preconizado pela diretriz nutricional da *American Society for parenteral and Enteral Nutrition* (ASPEN) que haja uma progressão lenta e gradual do aporte nutricional para não ocasionar uma hiperalimentação de forma exógena e para reduzir mortalidade e tempo de internação¹⁵.

Para tal conduta nutricional, utiliza-se as recomendações nutricionais preconizadas pelas diretrizes vigentes da *Society for parenteral and Enteral Nutrition* (ASPEN)¹⁵, *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism* (ESPEN)²⁴ ou Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (BRASPEN)²⁵. É recomendado que se escolha a via alimentar mais fisiológica, portanto, a que utiliza o trato gastrointestinal e mais segura no momento, respeitando a fase da doença (fase aguda ou crônica) para estabelecer o aporte nutricional. Além disso é importante avaliar o estado nutricional utilizando algumas ferramentas, de triagem nutricional como a Modified Nutrition Risk in Critical ill (mNUTRIC)²⁶ (ANEXO 1)²⁷ que foi validada para a população crítica e busca investigar se esse paciente está em risco nutricional e de avaliação nutricional para o diagnóstico nutricional como a AND-ASPEN²⁹ criado pela Nutrition and Dietetics (AND) e a ASPEN (ANEXO 2)²⁸.

Um estudo observacional prospectivo com 414 pacientes do trauma que utilizou o AND-ASPEN para realizar o diagnóstico nutricional, constatou que 26,8% pacientes

admitidos na UTI estavam desnutridos, evidenciando que a desnutrição aumentou a mortalidade em 1,96 vezes (95% CI, 1.13–3.30; $P = .015$)³⁰.

Com base no exposto, a hipótese do presente estudo é de que pacientes sépticos críticos, com fornecimento nutricional insuficiente, podem ter a redução da efetividade das mitocôndrias, consequente ineficiência do sistema imunológico em combater a infecção em questão e aumento do tempo de internação na UTI e/ou índice de mortalidade. E a literatura ainda é pouco clara sobre os benefícios da nutrição como adjuvante no tratamento da sepse. Posto isso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do aporte nutricional no tratamento da sepse abdominal e a possível redução sobre a mortalidade e o tempo de internação de pacientes da UTI.

3. JUSTIFICATIVA

Esta pesquisa justifica-se pela necessidade de se buscarem subsídios que confirmem se a nutrição precoce pode auxiliar no tratamento da sepse, bem como se pacientes com baixa oferta nutricional têm maiores chances de ficarem mais tempo internados nas unidades de terapia intensiva ou de evoluírem para óbito.

Ainda não há na literatura estudos que sejam estruturados com coleta de dados na fase aguda (primeiros 3 dias), fase estável (do dia 4 ao dia 6) e fase crônica (após o dia 7) do paciente crítico, mesmo que nesses momentos ocorrem mudanças no aporte nutricional conforme recomendado pelas diretrizes nutricionais vigentes (ASPEN, ESPEN, BRASPEN) e, conforme a literatura, as mitocôndrias podem apresentar fase de biogênese entre os dias 3 a 5 da sepse.

Vale ressaltar que não foram encontrados estudos que avaliassem o risco e o diagnóstico nutricional no dia do diagnóstico de sepse, bem como uma semana após. Esse dado é muito importante, visto que em 7 dias o estado nutricional do paciente crítico pode mudar pois, na maioria das vezes, ele se encontra em intenso catabolismo proteico, podendo também já ter chegado desnutrido ao hospital. Além disso, a dosagem de balanço nitrogenado, por mais que seja uma aferição fácil de ser realizada e de baixo custo, não é rotina na maioria das UTIs, mesmo sendo uma grande aliada para as nutricionistas, através dela podem saber se o aporte proteico está de acordo com as necessidades do paciente.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do aporte nutricional no tratamento da sepse abdominal e a possível redução sobre a mortalidade e o tempo de internação de pacientes da UTI.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar estado nutricional no dia do diagnóstico da sepse abdominal e no sétimo dia de terapia nutricional;
- Avaliar se a terapia nutricional foi iniciada precocemente (dentro das 24-48h do diagnóstico de sepse abdominal e/ou estabilidade clínica);
- Avaliar aporte nutricional no primeiro, terceiro e sétimo dia de terapia nutricional;
- Avaliar adequação da oferta proteica através da dosagem do balanço nitrogenado (urina de 24h) no dia do diagnóstico da sepse abdominal e no primeiro, terceiro e sétimo dia de terapia nutricional;
- Avaliar a produção de ATP nas mitocôndrias, via amostra de plasma sanguíneo, no dia do diagnóstico de sepse abdominal e no primeiro, terceiro e sétimo dia de terapia nutricional;
- Avaliar a concentração sérica da proteína ligadora de ácidos graxos intestinal (I-FABP);
- Avaliar exames laboratoriais com base na coleta de sangue no dia do diagnóstico de sepse abdominal, no primeiro, terceiro e sétimo dia de terapia nutricional; sendo eles: proteína C-reativa (PCR), hemograma, gasometria arterial, lactato, albumina, magnésio, cálcio, fósforo, potássio, creatina, ureia, bilirrubinas, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP);
- Avaliar sinais vitais para identificar o estado hemodinâmico do paciente; sendo eles: pressão arterial média, pressão sistólica e diastólica, saturação, temperatura e glicemia.

5. MATERIAIL E MÉTODOS

Delineamento

Trata-se de um estudo transversal observacional prospectivo.

População e amostra

A população será composta por pacientes internados na UTI de um complexo hospitalar da Santa Casa admitidos entre **dezembro de 2023 a agosto de 2024**. Serão incluídos na amostra pacientes com idade ≥ 18 anos, que tiverem diagnóstico de sepse abdominal até 48h após internação e que receberem terapia nutricional durante os primeiros 7 dias de internação. Serão excluídos aqueles pacientes que necessitarem de vasopressina em qualquer volume ou noradrenalina $> 0,4$ mcg/kg/min nos primeiros 7 dias de aporte nutricional.

Os pacientes serão recrutados na UTI do Hospital Santa Clara da Irmandade Santa Casa De Misericórdia de Porto Alegre, a partir do diagnóstico feito pela equipe assistencial. O paciente será convidado a participar do estudo e, caso aceite, deverá assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. No caso de o paciente não poder dar seu consentimento, este será solicitado a um familiar responsável. Ambas as versões do TCLE (paciente e responsável) estão em anexo. Após a assinatura do TCLE, os dados e amostras serão coletados conforme descrito abaixo.

Foi calculado um tamanho de amostra de 238 pacientes (119 por grupo) para encontrar percentuais de óbito de 7.7% e 21% entre pacientes sem e com risco nutricional, respectivamente³¹. Foi adotado poder de 80% e nível de significância de 5%. O cálculo foi realizado no software G*Power 3.1.9.7.

Coleta de dados

A coleta de dados será realizada através do prontuário eletrônico com o auxílio de uma ficha elaborada em formulário do *Google Forms*.

Serão extraídos dados de idade, gênero, data de internação na UTI, data da alta da UTI ou da ocorrência de óbito, data do diagnóstico de sepse e data de quando iniciou terapia nutricional. Além disso serão coletados exames laboratoriais no dia do diagnóstico de sepse, nos dias um, três e sete de terapia nutricional como proteína-C reativa, lactato, gasometria arterial, fósforo, magnésio, potássio, hemograma, albumina, bilirrubinas, creatinina, ureia, transaminase oxalacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP), parâmetros ventilatórios para aqueles que necessitaram de ventilação mecânica.

Da parte nutricional serão coletados dados antropométricos como, peso, altura, índice de massa corporal e medidas antropométricas de circunferência do braço e

panturrilha (quando disponível), risco nutricional e diagnóstico nutricional na chegada da UTI. Além disso, serão coletados dados acerca da necessidade calórica proteica estimada pela nutricionista e via de alimentação, será analisado tempo para iniciar a terapia nutricional e tempo para atingir aporte pleno.

Será aferido o balanço nitrogenado através da urina de 24h e a produção de ATP pelas mitocôndrias será analisado através do plasma sanguíneo no sistema LC-MS/MS³².

Coleta de sangue e determinação de ATP por cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)³² e dosagem da proteína ligadora de ácidos-graxos intestinal

Uma amostra de sangue venoso de 10 mL será coletada nos seguintes momentos: dia do diagnóstico e no 1º, 3º e 7º dias após o diagnóstico. A coleta será feita por acesso venoso já disponível, sem nova necessidade de intervenção no paciente, por profissional capacitado e habilitado. As amostras serão coletadas em tubos do tipo vacuotainer apropriados para separação de plasma, identificados por código numérico, sem identificação de dados pessoais do paciente. Os tubos serão transportados em recipiente adequado e refrigerado até a Central Analítica da UFCSPA, onde serão centrifugados para separação do plasma, o qual será aliquoteado em microtubos com frações de 100 µL cada, e armazenados em freezer -80 °C até o processamento.

Para a determinação do ATP, uma amostra do plasma sanguíneo de 50 µL será adicionada em 100 µL de acetonitrila, centrifugada por 10 min e será injetado diretamente no sistema LC-MS/MS. Um sistema Nexera-i LC-2040C Plus acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo triplo LCMS-8045 (Shimadzu, Japão) será usado para a análise. A separação foi realizada em uma coluna Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) (Waters, EUA) usando 0,1% de tributilamina e 0,03% de ácido acético em água (solução A) e acetonitrila (solução B) a uma taxa de fluxo de 300µL/min e uma temperatura de 60°C da seguinte forma: 0-1,5min, 15-90% de B; 1,5-3,0min, 90% de B; 3,0-3,2min, 90-15% de B; e 3,2-8min, 15% de B. As análises serão conduzidas com ionização por eletrospray no modo negativo (ESI-, [M-H]-), empregando os seguintes parâmetros otimizados: fluxo de gás nebulizador, 3 L/min; fluxo de gás de aquecimento, 10 L/min; temperatura da interface, 300°C; temperatura de dessolvatação, 525°C; temperatura DL, 250°C; temperatura do bloco de aquecimento, 400°C; Fluxo de gás de secagem, 10 L/min. Cromatogramas de íons extraídos de monitoramento de múltiplas reações (MRM) serão gerados usando as seguintes transições para detecção de ATP:

m/z 506,0 → 158,9, transição do quantificador; m/z 506,0 → 407,9, transição de qualificador 1; m/z 506,0 → 78,9, transições qualificadoras 2. A análise do tratamento dos dados será realizada usando o software LabSolutions (Shimadzu, Japão).

Para a determinação da concentração sérica da proteína ligadora de ácidos graxos intestinal, será utilizado um kit de Elisa, conforme protocolo do fabricante.

Análise de dados

Serão calculadas as estatísticas descritivas média e desvio padrão para as variáveis quantitativas paramétricas, mediana e amplitude interquartil para as variáveis quantitativas não paramétricas e frequência absoluta e relativa para as variáveis categóricas. A comparação entre grupos de interesse será feita por teste t de Student, Mann-Whitney ou Qui-quadrado, respeitando-se a distribuição das variáveis. As análises serão realizadas no pacote estatístico SPSS 22.0.

6. ORÇAMENTO

	Quantidade	Valor unitário	Valor Total
Adenosine-15N55'-triphosphate disodium salt solution. Descrição: 100 mM (in 5mM Tris HCl/ H2O), ≥98atom%15N, ≥95%(CP). Fórmula empírica: C10H1415N5Na2O13P313P3	2	R\$ 700,00	R\$ 1400,00
Human IFABP/FABP2(Intestinal Fatty Acid Binding Protein) ELISA Kit	2	R\$ 4200,00	R\$ 8400,00
		Valor total	R\$ 9800,00

Os demais insumos necessários para realização das análises (determinação de ATP e ensaio de ELISA) como tubos de coleta de sangue, microtubos, ponteiros plásticos,

insumos para a cromatografia, e todos os reagentes estão disponíveis na Central Analítica, oriundos de outras pesquisas do grupo que não utilizarão mais estes insumos, de modo que não configuram novo custo e contribuem para a otimização do uso de recursos de pesquisa.

7. CRONOGRAMA

2023	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Revisão de Literatura	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aprovação pelo CEP										X	X	X
2024	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Coleta de dados	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Entrega do relatório			X									
Análise dos dados								X	X	X		
Escrita dos artigos científicos			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Submissão dos artigos											X	X
2025	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Submissão dos artigos	X	X										
Defesa da dissertação			X									

Table 1. The scoring system for classification of NUTRIC and mNUTRIC [29,31].

Variables Included in NUTRIC	Scoring System (Points)			
	0	1	2	3
Ages, years	<50	50–74	≥75	
Co-morbidities	0–1	≥2		
Days from hospital to ICU	0	≥1		
APACHE	<15	15–19	20–27	≥28
SOFA	<6	6–9	≥10	
Interleukin 6, pg/mL	<400	≥400		
Low NUTRIC	0–5 Points			
High NUTRIC	6–10 Points			
Modified NUTRIC	(without Interleukin 6)			
Low mNUTRIC	0–4 Points			
High mNUTRIC	5–9 Points			

ICU: Intensive care unit; APACHE: Acute physiology and chronic health evaluation; SOFA: Sequential organ failure assessment.

ANEXO 2:²⁹

Table 1. Academy/A.S.P.E.N. Clinical Characteristics That the Clinician Can Obtain and Document to Support a Diagnosis of Malnutrition

Clinical Characteristic	Malnutrition in the Context of Acute Illness or Injury		Malnutrition in the Context of Chronic Illness		Malnutrition in the Context of Social or Environmental Circumstances	
	Nonsevere (Moderate) Malnutrition	Severe Malnutrition	Nonsevere (Moderate) Malnutrition	Severe Malnutrition	Nonsevere (Moderate) Malnutrition	Severe Malnutrition
(1) Energy intake¹ Malnutrition is the result of inadequate food and nutrient intake or assimilation; thus, recent intake compared with estimated requirements is a primary criterion defining malnutrition. The clinician may obtain or review the food and nutrition history, estimate optimum energy needs, compare them with estimates of energy consumed, and report inadequate intake as a percentage of estimated energy requirements over time.	<75% of estimated energy requirement for >7 days	≤50% of estimated energy requirement for ≥5 days	<75% of estimated energy requirement for ≥1 month	≤75% of estimated energy requirement for ≥1 month	<75% of estimated energy requirement for ≥3 months	≤50% of estimated energy requirement for ≥1 month
(2) Interpretation of weight loss²⁻⁵ The clinician may evaluate weight in light of other clinical findings, including the presence of under- or overhydration. The clinician may assess weight change over time reported as a percentage of weight lost from baseline.	% 1–2 5 7.5 Time 1 wk 1 mo 3 mo	% >2 >5 >7.5 Time 1 wk 1 mo 3 mo	% 5 7.5 10 20 Time 1 mo 3 mo 6 mo 1 y	% >5 >7.5 >10 >20 Time 1 mo 3 mo 6 mo 1 y	% 5 7.5 10 20 Time 1 mo 3 mo 6 mo 1 y	% >5 >7.5 >10 >20 Time 1 mo 3 mo 6 mo 1 y
Physical Findings^{5,6} Malnutrition typically results in changes to the physical exam. The clinician may perform a physical exam and document any one of the physical exam findings below as an indicator of malnutrition.						
(3) Body fat Loss of subcutaneous fat (eg, orbital, triceps, fat overlying the ribs)	Mild	Moderate	Mild	Severe	Mild	Severe
(4) Muscle mass Muscle loss (eg, wasting of the temples [temporalis muscle], clavicles [pectoralis and deltoids], shoulders [deltoids], interosseous muscles, scapula [latissimus dorsi, trapezius, deltoids], thigh [quadriceps], and calf [gastrocnemius])	Mild	Moderate	Mild	Severe	Mild	Severe
(5) Fluid accumulation The clinician may evaluate generalized or localized fluid accumulation evident on exam (extremities, vulvar/scrotal edema, or ascites). Weight loss is often masked by generalized fluid retention (edema), and weight gain may be observed.	Mild	Moderate to severe	Mild	Severe	Mild	Severe

(continued)

Table 1. (continued)

Clinical Characteristic	Malnutrition in the Context of Acute Illness or Injury		Malnutrition in the Context of Chronic Illness		Malnutrition in the Context of Social or Environmental Circumstances	
	Nonsevere (Moderate) Malnutrition	Severe Malnutrition	Nonsevere (Moderate) Malnutrition	Severe Malnutrition	Nonsevere (Moderate) Malnutrition	Severe Malnutrition
(6) Reduced grip strength⁷ Consult normative standards supplied by the manufacturer of the measurement device	NA	Measurably reduced	NA	Measurably reduced	NA	Measurably reduced

A minimum of 2 of the 6 characteristics above is recommended for diagnosis of either severe or nonsevere malnutrition. NA, not applicable.

Notes:

Height and weight should be measured rather than estimated to determine body mass index (BMI).

Usual weight should be obtained to determine the percentage and to interpret the significance of weight loss.

Basic indicators of nutrition status such as body weight, weight change, and appetite may substantively improve with refeeding in the absence of inflammation. Refeeding and/or nutrition support may stabilize but not significantly improve nutrition parameters in the presence of inflammation.

The National Center for Health Statistics defines *chronic* as a disease/condition lasting 3 months or longer.⁸

Serum proteins such as serum albumin and prealbumin are not included as defining characteristics of malnutrition because recent evidence analysis shows that serum levels of these proteins do not change in response to changes in nutrient intake.⁹⁻¹²

8. REFERÊNCIAS

- 1- BONE, Roger C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.
- 2- SINGER, Mervyn et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.
- 3- SPECTOR, W. G.; WILLOUGHBY, D. A. Vasoactive amines in acute inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 116, n. 3, p. 839-846, 1964.
- 4- MENKIN, Valy; WARNER, Charlotte R. Studies on inflammation: XIII. Carbohydrate metabolism, local acidosis, and the cytological picture in inflammation. **The American journal of pathology**, v. 13, n. 1, p. 25, 1937.
- 5- THOMPSON, Kelly; VENKATESH, Balasubramanian; FINFER, Simon. Sepsis and septic shock: current approaches to management. **Internal Medicine Journal**, v. 49, n. 2, p. 160-170, 2019.
- 6- VINCENT, J. -L. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure: On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine (see contributors to the project in the appendix). 1996.
- 7- Organização Pan-Americana de Saúde [homepage na internet]. OMS pede ação global contra a pese – causa de uma em cada cinco mortes no mundo [acesso em

30 nov 2022]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-9-2020-oms-pede-acao-global-contrasepse-causa-uma-em-cada-cinco-mortes-no-mundo>.

- 8- Instituto Latino-Americano de Sepsis. Programa de melhoria de qualidade, protocolos gerenciados de sepsis – relatório nacional 2021. São Paulo: 2022, p.1-9.
- 9- FLEISCHMANN-STRUZEK, C. et al. Incidence and mortality of hospital-and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. **Intensive care medicine**, v. 46, p. 1552-1562, 2020.
- 10- MCCLAVE, Stephen A. et al. Mitochondrial dysfunction in critical illness: implications for nutritional therapy. **Current Nutrition Reports**, v. 8, p. 363-373, 2019.
- 11- FAVRETTO, Thalia. Avaliação da função mitocondrial em linfócitos e terapia nutricional em pacientes com choque séptico do Hospital Conceição de Porto Alegre. 2021.
- 12- KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, p. 1237-1239, 2016.
- 13- KRAFT, Bryan D. et al. Peripheral blood mononuclear cells demonstrate mitochondrial damage clearance during sepsis. **Critical care medicine**, v. 47, n. 5, p. 651, 2019.
- 14- SINGER, Mervyn. Critical illness and flat batteries. **Critical Care**, v. 21, n. 3, p. 69-73, 2017.
- 15- MCCLAVE, Stephen A. et al. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN). **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 40, n. 2, p. 159-211, 2016.
- 16- PASINATO, Valeska Fernandes et al. Terapia nutricional enteral em pacientes sépticos na unidade de terapia intensiva: adequação às diretrizes nutricionais para pacientes críticos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, p. 17-24, 2013.
- 17- TOLEDO, Diogo Oliveira et al. Campanha “Diga não à desnutrição”: 11 passos importantes para combater a desnutrição hospitalar. **CEP**, v. 5652, p. 900, 2018.

- 18- CORREIA, Maria Isabel TD; PERMAN, Mario Ignacio; WAITZBERG, Dan Linetzky. Hospital malnutrition in Latin America: A systematic review. **Clinical nutrition**, v. 36, n. 4, p. 958-967, 2017.
- 19- HIURA, Grant; LEBWOHL, Benjamin; SERES, David S. Malnutrition diagnosis in critically ill patients using 2012 Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition standardized diagnostic characteristics is associated with longer hospital and intensive care unit length of stay and increased in-hospital mortality. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 256-264, 2020.
- 20- DE JESUS, Camila Anjos et al. Adequação calórico-proteica, nutrição enteral precoce e tempo de permanência de pacientes críticos em uma unidade de terapia intensiva. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, 2021.
- 21- MAIA, Larissa Araújo et al. Nutrição enteral precoce e desfechos clínicos em pacientes críticos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 19962-19972, 2020.
- 22- SUN, Jia-Kui et al. Effects of permissive hypocaloric vs standard enteral feeding on gastrointestinal function and outcomes in sepsis. **World journal of gastroenterology**, v. 27, n. 29, p. 4900, 2021.
- 23- NADAMUNI, Mridula; VENABLE, Andrea H.; HUEN, Sarah C. When a calorie isn't just a calorie: a revised look at nutrition in critically ill patients with sepsis and acute kidney injury. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 31, n. 4, p. 358-366, 2022.
- 24- SINGER, Pierre et al. ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit. **Clinical nutrition**, v. 38, n. 1, p. 48-79, 2019.
- 25- CASTRO, Melina Gouveia et al. Diretriz brasileira de terapia nutricional no paciente grave. **BRASPEN J**, v. 33, n. 1, p. 2-36, 2018.
- 26- RAHMAN, Adam et al. Identifying critically-ill patients who will benefit most from nutritional therapy: further validation of the “modified NUTRIC” nutritional risk assessment tool. **Clinical nutrition**, v. 35, n. 1, p. 158-162, 2016.
- 27- MAYR, Ulrich et al. NUTRIC and modified NUTRIC are accurate predictors of outcome in end-stage liver disease: a validation in critically ill patients with liver cirrhosis. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2134, 2020.
- 28- MALONE, Ainsley; HAMILTON, Cynthia. The Academy of Nutrition and Dietetics/the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition consensus

- malnutrition characteristics: application in practice. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 28, n. 6, p. 639-650, 2013.
- 29- WHITE, Jane V. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 5, p. 730-738, 2012.
- 30- CENICCOLA, Guilherme Duprat et al. Association between AND-ASPEN malnutrition criteria and hospital mortality in critically ill trauma patients: a Prospective Cohort Study. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 44, n. 7, p. 1347-1354, 2020.
- 31- AUIWATTANAKUL, Supakrit, et al. Effects of nutrition factors on mortality and sepsis occurrence in a multicenter university-based surgical intensive care unit in Thailand (THAI-SICU study). **Nutrition**, v. 58, p. 94-99, 2019.
- 32- NAASANI, Liliana Ivete Sousa et al. Epidermal melanocytes metabolize extracellular nucleotides by purinergic enzymes. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 101, n. 3, p. 259-266, 2023.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

**Avaliação de parâmetros de massa muscular e de hidratação durante a
internação na UTI e associação com desfechos clínicos: um estudo de coorte
prospectivo**

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Flávia Moraes Silva

Porto Alegre, setembro de 2021.

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
JUSTIFICATIVA.....	13
OBJETIVO GERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
METODOLOGIA	14
ANÁLISE DOS DADOS.....	22
ASPECTOS ÉTICOS.....	22
CRONOGRAMA	23
ORÇAMENTO	23
REFERENCIAS.....	25
APÊNDICE I.....	36
APÊNDICE II.....	40
APÊNDICE III.....	50
APÊNDICE IV.....	51

RESUMO

Introdução: A depleção de massa muscular (MM) e a presença de hiper-hidratação são condições altamente prevalentes em pacientes críticos e associadas com piores desfechos clínicos. Entretanto, os métodos disponíveis na prática clínica para avaliar essas condições são limitados. O uso de ultrassom (US) para avaliação de depleção de MM ao longo da internação na UTI parece ser promissor, porém ainda são necessários estudos para contribuir com a padronização do método. A bioimpedância (BIA) também tem se destacado no cenário de UTI por ser uma técnica não invasiva e de baixo custo. Parâmetros brutos oriundo da BIA, como ângulo de fase (AF) e análise vetorial da impedância elétrica (BIVA), são considerados indicadores prognósticos e de hidratação, respectivamente. Todavia, a investigação da capacidade preditiva desses parâmetros avaliados durante a internação na UTI requer confirmação.

Objetivos: Avaliar a alteração de parâmetros de massa muscular e de hidratação durante a internação na UTI e sua associação independente com desfechos clínicos. **Métodos:** Estudo de coorte prospectivo com amostra de pacientes adultos (≥ 18 anos), em ventilação mecânica (VM), admitidos na UTI nas últimas 24 horas com previsão de permanência na UTI por pelo menos 72 horas. Serão coletados os dados clínicos e sociodemográficos de prontuário eletrônico. O estado nutricional será avaliado na admissão na UTI utilizando os critérios propostos pelo *Global Leadership Initiative on Malnutrition* (GLIM). A avaliação de MM por US do músculo reto-femoral e vasto intermediário será realizada na admissão, e a cada 3 dias nas primeiras duas semanas de internação na UTI. A avaliação antropométrica será realizada na admissão, após sete e 14 dias e incluirá os parâmetros de circunferência da panturrilha (CP), circunferência do braço (CB) e espessura do músculo adutor do polegar (EMAP). A bioimpedância será realizada no primeiro, terceiro, quinto, sétimo e 14 dia de internação na UTI e serão mensurados os parâmetros de AF e BIVA. Força e função muscular serão avaliados na alta da UTI, utilizando os parâmetros de força do aperto de mão (FAM) e PFIT-s (*Physical Function in Intensive Care Test-scored*), respectivamente. A adequação da terapia nutricional será avaliada a partir da relação entre dieta prescrita e dieta infundida (fórmula, volume, calorias e proteína). Os pacientes serão acompanhados pelo prontuário eletrônico para coleta dos desfechos de tempo de utilização de VM, tempo de internação na UTI,

tempo de internação hospitalar e óbito intra-hospitalar e após 3 meses de alta hospitalar os pacientes serão contatos via ligação telefônica para coleta dos desfechos de reinternação hospitalar, qualidade de vida (*SF-36: Medical Outcomes Study 36-item Short-Form Health Survey*) e óbito. A análise dos dados será realizada no programa SPSS. O projeto de pesquisa será conduzido de acordo com os pressupostos éticos da Resolução 466/12 com previsão de conclusão de 15 meses. O custo previsto com o mesmo será de R\$ 4.070,00 e será de responsabilidade dos pesquisadores.

Palavras-chave: paciente crítico, massa muscular, ângulo de fase, análise vetorial da impedância elétrica, mortalidade

INTRODUÇÃO

A doença crítica envolve uma resposta metabólica ao estresse complexa, que cursa com ativação de células neuroendócrinas, alteração da resposta inflamatória e imunológica e secreção de hormônios do tecido adiposo e do trato gastrointestinal¹. A ativação dessas vias resulta em resistência à insulina, aumento do gasto calórico, mobilização de substratos energéticos e intenso catabolismo proteico². O exacerbado catabolismo de proteínas decorrente do estresse metabólico é necessário para a síntese de proteína de fase aguda e fatores de coagulação, além da proteína ser utilizada como importante substrato energético para células imunes e para gliconeogênese³.

Neste sentido, a associação entre alteração no metabolismo proteico, oxidação de aminoácidos, ingestão calórica e proteica reduzida, estado pró-inflamatório e imobilização prolongada resulta em depleção quantitativa de massa muscular (MM) e alteração da qualidade muscular⁴⁻⁷. De fato, é comum que os pacientes críticos apresentem perda de MM de maneira rápida e precoce. Estudo prospectivo⁸ avaliou MM de 22 pacientes adultos em ventilação mecânica (VM) durante os primeiros 10 dias de internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) através de ultrassonografia (US) e demonstrou redução de 30% na espessura muscular e na área transversal do vasto intermediário e do reto femoral. Puthucherry et al.⁹ recrutaram prospectivamente 63 pacientes internados na UTI e evidenciaram que a área transversal do reto femoral avaliada por US reduziu significativamente dos dias 1 a 7 (-12.5% [IC 95%, -35.4% a 24.1%]; $p = 0.002$), e continuou reduzindo até o dia 10 (-17.7% [IC 95%, -25.9% a 8.1%]; $p < 0.001$).

Além da elevada prevalência, a depleção de MM na UTI tem sido associada com piores desfechos clínicos intra-hospitalares, como falha na extubação de pacientes submetidos à ventilação mecânica¹⁰, tempo de internação hospitalar prolongado¹¹⁻¹² e óbito¹³⁻¹⁵. Nesse sentido, a depleção de MM é considerada um indicador relevante de morbidade e mortalidade em pacientes críticos, o que reforça a importância do seu monitoramento durante a internação na UTI.

Entretanto, avaliar massa muscular no paciente crítico é um desafio devido à necessidade de adotar um método que seja facilmente implantado dentro das configurações restritas de UTIs, apresentar o mínimo de risco possível para o paciente e mensurar com precisão a quantidade e qualidade muscular tanto em

medidas pontuais quanto em avaliações seriadas⁴. Diferentes métodos são recomendados para avaliação de MM, como *dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA), ressonância magnética, tomografia computadorizada, US, bioimpedância (BIA) e medidas antropométricas¹⁶⁻¹⁷. Embora o DEXA seja considerado o padrão-ouro, o método envolve radiação e não está disponível nas UTIs devido ao elevado custo¹⁷. A ressonância magnética e tomografia computadorizada são técnicas de imagem precisas e acessíveis, que são capazes de detectar infiltrações de tecido adiposo no músculo e quantificar o músculo esquelético livre de gordura. Entretanto, o paciente precisa ser transportado para fora da UTI, as técnicas requerem profissionais especializados, envolvem exposição à radiação, disponibilidade de tempo, software específico e não são recomendadas para realizar medidas seriadas e monitorar alteração de massa muscular¹.

A utilização de imagens de US para avaliação da quantidade e qualidade do músculo esquelético no paciente crítico é alvo de diversas pesquisas e parece ser uma técnica promissora, devido a sua capacidade de monitorar alterações no tecido muscular ao longo do tempo e pelo seu potencial de avaliar o impacto da terapia nutricional. A quantidade de massa muscular é avaliada a partir da espessura, área transversal ou volume de diferentes grupos musculares, como bíceps¹⁸, quadríceps¹⁹, flexor ulnar²⁰ e reto abdominal²¹. Enquanto a qualidade muscular é determinada a partir da ecogenicidade, que está associada com a integridade do músculo e reflete a biomecânica muscular, infiltração gordurosa e presença de mionecrose²². Sendo assim, quanto menor as estimativas de ecogenicidade, maior a densidade e qualidade muscular²³. A depleção de MM durante a internação na UTI avaliada por US é descrita em vários estudos. Wandrag et al²⁴. avaliaram três grupos musculares por US (bíceps, antebraço e coxa) e demonstraram redução significativa nos primeiros 7 e 14 dias de internação na UTI [- 1.1 (-1.5 a -0.7), $p < 0.0001$] e [-1.67 (-2.3 a -1), $p < 0.0001$], respectivamente. Estudo piloto²⁵ com 26 pacientes avaliou MM nos dias 3, 5, 7 e 10 a partir do início de VM e demonstrou reduções significativas na área transversal do músculo reto femoral em todos os dias quando comparado com a primeira mensuração (dia 10: -14,9% $\pm$ 8,2 $p < 0,001$). Estudo brasileiro²⁶ envolvendo 74 pacientes avaliou perda de massa muscular através da espessura do quadríceps de ambas as coxas e demonstrou redução de 15% (IC 95%, 10.5%

-19.4%) no membro inferior direito e 12.7% (IC 95%, 9.1% -16.3%) no membro inferior esquerdo entre o primeiro e o sétimo dia de internação na UTI.

As limitações do uso de ultrassom cursam com a falta de consenso e padronização sobre o protocolo ideal de medição: avaliar os grupos musculares isolados ou combinados, melhor local anatômico da medição, ângulo que o transdutor deve ser posicionado, mensuração da espessura ou da área transversal muscular^{4,23}. Ainda, pacientes obesos podem apresentar limites das fáscias musculares indistinguíveis devido a infiltração de gordura, o que compromete a mensuração da espessura do músculo nessa população⁴. Por fim, não existe padronização da compressão do transdutor mais adequada em pacientes com acúmulo de fluidos. Alguns estudos²⁷ descrevem aplicação de compressão total do transdutor para minimizar o viés de confusão do edema, embora essa técnica possa alterar o tamanho e a forma do músculo. Enquanto outros pesquisadores²⁸, referem compressão mínima nesses casos. De qualquer forma, o ultrassom é um método prático, acessível no cenário de UTI e não invasivo que avalia quantidade e qualidade do tecido muscular e apresenta valor prognóstico identificado em vários estudos. Sendo assim, estudos bem delineados com descrição detalhada do protocolo utilizado são necessários para contribuir com a padronização universal da prática. Além do valor prognóstico, a depleção de MM avaliada por US tem sido estudada como potencial método para nortear a terapia nutricional. De fato, ensaio clínico randomizado²⁹ envolvendo 60 pacientes críticos teve o objetivo de comparar a oferta proteica de dois grupos: protocolo de dieta enteral com alto teor proteico (utilizando volume-alvo e suplementação proteica) versus o tratamento padrão. Foi demonstrado diferença significativa na oferta de proteína e energia entre os grupos de 0.45 g/kg (IC de 95%, 0.33 – 0.56; $p < 0.001$) e 2.8 kcal/kg (95% CI, 0.67 – 4.9, $p = 0.01$), respectivamente. A depleção de MM avaliada pela espessura do quadríceps mensurada por US foi atenuada em 0.22 cm (IC de 95%, 0.06–0.38, $p = 0.01$) no grupo com maior aporte proteico. De qualquer forma, a associação entre adequação da terapia nutricional e a depleção de MM avaliada por US requer investigação.

A bioimpedância é caracterizada como uma técnica não invasiva, acessível e de fácil reprodutibilidade para avaliação de composição corporal a beira leito³⁰. A partir de eletrodos posicionados nas extremidades do corpo do paciente, gera-se uma corrente elétrica de frequência única ou de frequências

múltiplas e são caracterizados os componentes corporais. A partir dos parâmetros de resistência e reactância são calculados, através de equações validadas em indivíduos saudáveis, indicadores de composição corporal, como índice de massa livre de gordura (IMLG) e massa gorda e parâmetros de hidratação, como água intra e extracelular e água corporal total³¹. Entretanto, em pacientes com aumento de acúmulo de fluido, devido à insuficiência cardíaca, renal ou doença crítica³², o IMLG é superestimado e não deve ser considerado para avaliação de massa muscular. Isso ocorre, pois, as equações disponíveis foram validadas em pacientes com homeostase de fluidos e conteúdo de água constante³³.

Tendo em vista que retenção hídrica é uma condição frequente em pacientes críticos, tem-se estudado o uso de valores brutos que são medidos diretamente da BIA e não são influenciados pelo estado de hidratação, como o ângulo de fase (AF). O AF é calculado a partir da resistência e reactância, reflete a integridade da membrana e a distribuição de água intra e extracelular e tem sido considerado um importante parâmetro prognóstico em pacientes críticos^{33,34}. De fato, coorte prospectiva³⁵ desenvolvida em UTI brasileira com 86 pacientes evidenciou que AF reduzido foi preditor de internação prolongada na UTI [OR = 2.06, IC95% (1.30 - 3.27)]. Estudo de coorte multicêntrico³³ incluindo o Brasil (Pelotas) e mais 8 países avaliou mais de 900 pacientes e demonstrou que o valor de AF na admissão na UTI foi associado independentemente com mortalidade. Yao et al.³⁶ demonstraram que valores de AF foram associados com mortalidade em 7 e 90 dias em 210 pacientes críticos. Estudos também se propuseram a investigar a capacidade do AF para identificar desnutrição. Coorte³⁷ conduzida no Brasil com 169 pacientes críticos demonstrou que AF reduzido foi associado independentemente com desnutrição (OR = 2.33, IC 95% 1.23 - 4.41). Além da capacidade preditiva do AF, estudos também avaliam a validade concorrente do parâmetro com métodos referência para avaliação de MM. Coorte prospectiva³⁸ realizada com 110 pacientes evidenciou forte correlação ($r = 0.701$, $p < 0.001$) entre o AF mensurado na admissão e a densidade do músculo esquelético avaliada pela tomografia computadorizada. Estudo³⁹ envolvendo 71 pacientes com o objetivo de avaliar a acurácia do AF para prever redução de MM, considerando a tomografia computadorizada como método de referência, demonstrou área sob a curva ROC de 0.78 quando foram incorporados covariáveis ao modelo de regressão logística (idade, sexo, índice de massa corporal, Índice de comorbidade

de Charlson e tipo de admissão).

Embora vários estudos⁴⁰⁻⁴² demonstrem o valor prognóstico do AF mensurado na admissão, estudos avaliando medidas seriadas do parâmetro ao longo da internação na UTI são escassos. Denneman et al.⁴³ avaliaram valores de AF ao longo da primeira semana de internação de 156 pacientes internados na UTI e demonstram diferença estatisticamente significativa entre os dias 1 e 3 ($4.9^\circ \pm 1.3^\circ$ versus $4.5^\circ \pm 1.3^\circ$; $p < 0.01$) e entre os dias 1 e 7 ($4.9^\circ \pm 1.3^\circ$ versus $4.3^\circ \pm 1.6^\circ$; $p < 0.01$), porém não foi investigada associação com desfechos clínicos. Ellegård et al.⁴⁴ avaliaram o AF na admissão e na alta da UTI de 26 pacientes. Foi demonstrado aumento no AF no grupo de pacientes que sobreviveu $0.62 \pm 1.24^\circ$ (não significativo) e redução nos pacientes que foram a óbito $0.24 \pm 0.82^\circ$ ($p = 0.06$), com diferença de 0.86° ($p = 0.048$) entre os grupos. Estudo multicêntrico já citado³³, avaliou AF no dia 5 de internação na UTI de 527 pacientes e não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre sobreviventes e não-sobreviventes (4.8 ± 2.2 versus 4.5 ± 2.3 , $p = 0.007$). Estudos com o objetivo de avaliar o impacto da terapia nutricional (TN) sob valores de AF também são escassos na literatura. Gonzalez-Granda et al.⁴⁵ randomizaram dois grupos de pacientes para oferta de necessidades nutricionais calculadas a partir da calorimetria indireta (CI) versus equações preditivas com o objetivo de avaliar o impacto da TN sob o ângulo de fase. O AF não o mudou significativamente da admissão até a alta no grupo com necessidades nutricionais calculadas a partir de CI ($3.20^\circ \pm 1.07^\circ$ a $3.34^\circ \pm 1.42^\circ$), enquanto o grupo com necessidades calculadas a partir de equações preditivas apresentou uma tendência de declínio no AF ($3.31^\circ \pm 1.34^\circ$ a $2.95^\circ \pm 1.15^\circ$; $p = 0.077$). Ainda, o AF médio aumentou no grupo em que foi utilizada a CI [$0.14^\circ \pm 0.95^\circ$ (+ 5%)] e reduziu no grupo que foi adotado equações preditivas [$0.36^\circ \pm 0.86^\circ$ (-6%)]. Os autores especulam que essas tendências podem tornar-se estatisticamente significativas para ambos os grupos se uma amostra maior for examinada. Desta forma, são necessários mais estudos com o objetivo de associar a adequação da TN com os valores de AF.

Antropometria é um método de baixo custo e não invasivo amplamente utilizado na prática clínica pela sua praticidade. O indicador antropométrico mais estudado^{46,47} em pacientes críticos é a espessura do musculo adutor do polegar (EMAP), que apresenta consolidada associação com tempo de internação na UTI e no hospital e óbito. De fato, estudo de coorte envolvendo 248⁴⁸ pacientes

admitidos em UTIs médicas e cirúrgicas demonstrou que valores reduzidos de EMAP na admissão foram associados com maior risco de óbito [OR = 6.3, IC 95% (1.2 - 32.6)]. Estudo⁴⁹ incluiu 127 pacientes críticos e demonstrou que o EMAP mensurado na admissão foi associado independentemente com maior risco de óbito [OR = 5.6; IC 95% (0.02 – 0.12)], tempo de internação >10 dias [OR = 11.3; IC 95% (4.42–29.1)] e falência orgânica [OR = 14.5; IC 95%, (6.5 – 38.4)]. Valores reduzidos de circunferência do braço (CB), circunferência muscular do braço (CMB), área do braço e área muscular do braço também foram associados com piores desfechos clínicos.

Os parâmetros antropométricos também são mensurados repetidamente ao longo da internação na UTI, embora sua associação com desfechos clínicos seja pouco explorada na literatura. Estudo realizado no Irã⁵⁰ avaliou medidas antropométricas de 125 pacientes na admissão e na alta da UTI e demonstrou que a circunferência do braço (CB), circunferência muscular do braço (CMB), espessura da dobra cutânea tricipital (DCT) e a circunferência da panturrilha (CP) reduziram significativamente durante a internação na UTI ($p < 0.001$). Entretanto, não foi avaliada associação com desfechos clínicos. Nematy et al.⁵¹ avaliaram 22 pacientes neurológicos e também evidenciaram redução significativa da DCT entre a admissão e a alta da UTI (20.5 ± 8.3 versus 18.1 ± 7.6 , $p = 0.00$), porém não foi investigado associação com desfechos clínicos. Estudo brasileiro⁵² avaliou 60 pacientes e demonstrou redução estatisticamente significativa nas medidas de circunferência do braço (CB) e espessura do musculo adutor do polegar (EMAP) durante a primeira semana de internação na UTI, mas também não foi avaliado o valor prognóstico desses parâmetros. Embora a utilidade desses parâmetros antropométricos em pacientes críticos seja questionada pela presença de fatores que prejudicam a mensuração adequada (curativo, cateter, paciente em posição que limita a avaliação, acúmulo de fluido) estudos com o objetivo de avaliar a viabilidade, capacidade prognóstica e relação com a TN de parâmetros antropométricos avaliados ao longo da internação na UTI são escassos.

A depleção de massa muscular durante a internação na UTI também está associada com piores parâmetros de funcionalidade, força muscular e qualidade de vida (QV)⁵³. A fraqueza adquirida na UTI acomete 43% (25 – 75%)⁵⁴ dos pacientes e é associada com piores desfechos, como desmame tardio de VM em consequência da fraqueza muscular respiratória e mortalidade⁵⁵. Revisão

sistemática⁵⁶ teve como objetivo identificar as ferramentas utilizadas para avaliar força e função em pacientes críticos e determinar os parâmetros de confiabilidade, erro de medição, validade de construto e validade preditiva. A dinamometria, *Physical Function in Intensive Care Test-scored* (PFIT-s) e *Chelsea Critical Care Physical Assessment* (CPAx) foram apontados como os melhores parâmetros a serem adotados em cuidados intensivos. Selina et al.⁵⁷ avaliaram a relação entre os parâmetros de MM avaliados pelo US e medidas de força e função muscular ao despertar e na alta da UTI em 22 adultos em VM. Houve forte correlação ($r = 0.82$; $p < 0.01$) entre espessura do músculo vasto intermediário com o PFIT-s e escala de mobilidade na UTI (IMS: *ICU mobility scale*). A QV também tem sido apontada como um importante parâmetro para avaliação pós alta hospitalar, considerando o aumento da sobrevivência de pacientes críticos. Revisão sistemática⁵⁸ com o objetivo de identificar as ferramentas utilizadas para avaliação de QV pós-alta demonstrou que a escala mais utilizada foi o Medical Outcomes Study 36-Item Short Form Health Survey (SF-36) e que as avaliações foram realizadas mais comumente 6 e 12 meses após alta da UTI. A ferramenta SF-36 é validada no Brasil, apresenta validade satisfatória em pacientes críticos e é adequada para ser aplicada por ligação telefônica⁵⁹⁻⁶¹. De qualquer forma, estudos avaliando depleção de massa muscular e associação com desfechos de funcionalidade e força muscular na alta da UTI e QV pós alta hospitalar são limitados.

Além da depleção de massa muscular, outra condição comum no paciente crítico é a presença de acúmulo de fluidos em resposta à reposição volêmica⁶². O tratamento com administração intravenosa de fluídos apresenta diversas aplicabilidades na prática clínica, como reposição nos estados de hipovolemia ou alterações distributivas e ressuscitação para restaurar a circulação de órgãos vitais⁶³. Especialmente no contexto de cuidados intensivos, essa intervenção terapêutica é essencial como parte do tratamento de pacientes com sepse e choque. De fato, diretriz publicada no *Intensive Care Medicine*⁶⁴ recomenda fortemente que seja realizada ressuscitação com fluidos precocemente, pois a intervenção é eficaz e crucial para a estabilização da hipoperfusão induzida por sepse ou choque séptico.

Embora a terapia com administração de fluídos seja amplamente recomendada e difundida, uma das principais limitações da intervenção é a sobrecarga de volume, que está associada com aumento de morbidade e

mortalidade⁶⁵. De fato, estudo⁶⁶ envolvendo 730 UTIs em 84 países e mais de 1800 pacientes com sepse demonstrou que balanço hídrico cumulativo de 3 dias no quartil mais alto foi independentemente associado com óbito (HR = 1.63, IC 95% 1.25 – 2.12). Em concordância com esses resultados, estudo⁶⁷ com o objetivo de avaliar a associação entre balanço hídrico e desfechos clínicos de pacientes oncológicos internados em UTIs demonstrou que balanço hídrico positivo superior a 1100 ml/24h foi independentemente associado com mortalidade (OR = 5.14, IC 95% 1.45 - 18.24). A associação entre sobrecarga de volume e piores desfechos também é demonstrada quando os estudos são compilados em revisões sistemática com meta-análises. Revisão sistemática⁶⁸ envolvendo 34 estudos e 31076 pacientes demonstrou que balanço de fluido positivo foi associado com maior risco de mortalidade após 3 dias de admissão na UTI (OR = 1.44, IC 95% (1.18 - 1.77) e em qualquer momento durante a internação na UTI (OR = 1.39, IC 95% 1.15 – 1.69). Da mesma forma, revisão sistemática⁶⁹ com meta-análise demonstrou que pacientes com sepse ou choque séptico com balanço de fluido positivo apresentaram aumento de 70% no risco mortalidade.

Apesar da associação entre acúmulo de fluidos e piores desfechos estarem claramente descritas na literatura^{70,71}, essa avaliação é um desafio na UTI, devido à ausência de um método de referência disponível na prática clínica para avaliar adequadamente essa condição. O registro do balanço hídrico é o método geralmente utilizado nas UTIs e avaliado nos estudos, porém não considera perdas insensíveis e difíceis de quantificar, frequentemente é registrado de forma imprecisa e existe ampla variação do ponto de corte adotado para indicar balanço hídrico positivo^{72,73}. A presença de sinais clínicos evidenciados por edema periférico e pulmonar requer acúmulo prévio de 4-5 litros para que seja identificada sobrecarga de fluido, sendo caracterizado como um parâmetro tardio⁷⁴. Avaliação do ganho de peso também não é adequada, pois é necessário cama-balança e a perda de MM e gordura pode massacrar o ganho de fluidos⁶⁵. Técnicas radiológicas, índices de oxigenação, ultrassom pulmonar, ecocardiografia e pressão intra-abdominal também apresentam limitações⁷⁵.

Diante deste cenário, a análise vetorial da impedância elétrica (BIVA), oriunda da BIA, tem sido considerada um potencial parâmetro para avaliação de hiper-hidratação em pacientes com insuficiência cardíaca⁷⁶ e doença renal^{77,78}. BIVA é calculada a partir da resistência e reactância ajustados para a altura e não

requer o uso de equações preditivas e peso corporal⁷⁹. Alguns estudos avaliaram sua aplicabilidade para monitorar o estado de hidratação de pacientes críticos. Jones et al⁸⁰. avaliaram o parâmetro de BIVA em 61 pacientes nos primeiros 5 dias de internação na UTI e demonstraram que a correlação entre mudança de hidratação pelo BIVA e pelo balanço hídrico foi fraca ($r = 0.25$; $p = 0.05$) e a presença de hiper-hidratação pelo BIVA não foi associada com piores desfechos clínicos. Por outro lado, coorte prospectiva⁸¹, envolvendo 125 pacientes, avaliou hiper-hidratação durante as primeiras 120 horas de internação na UTI por dois métodos: sobrecarga de fluido (balanço hídrico cumulativo/peso na admissão) e BIVA, e apenas hiper-hidratação mensurada pelo BIVA foi associada com mortalidade (OR = 22.91, IC 95% 2.38 – 220.07). Considerando o número limitado de estudos que avaliam medidas seriadas do BIVA durante a internação na UTI e resultados controversos faz-se necessário o desenvolvimento de mais pesquisas sobre a temática.

JUSTIFICATIVA

A depleção de MM apresenta alta prevalência e influência na morbidade e mortalidade de pacientes críticos, mas sua avaliação ainda é um desafio. Embora a US pareça ser um método promissor na prática clínica, são necessários estudos adicionais que apresentem metodologia clara e detalhada com o objetivo de contribuir com a padronização do método. Ainda, estudos com o objetivo de avaliar parâmetros antropométricos durante a internação na UTI e sua validade preditiva são limitados. Da mesma forma, estudos que avaliem o impacto da TN nos parâmetros de MM e AF de pacientes críticos requerem investigação.

Embora seja evidenciado aumento da sobrevivência de pacientes críticos, essa tendência é acompanhada de elevada prevalência de pacientes com redução de funcionalidade, força muscular e QV pós alta hospitalar. Contudo, estudos investigando o papel da depleção de MM e da adequação da TN durante a internação na UTI sob esses parâmetros são escassos. Ademais, parâmetros brutos oriundos da BIA, como AF e BIVA são considerados relevantes indicadores prognósticos e de hidratação, respectivamente. Todavia, a investigação da capacidade preditiva desses parâmetros avaliados durante a internação na UTI requer confirmação.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a alteração de parâmetros de massa muscular e de hidratação durante a internação na UTI e sua associação com desfechos clínicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o valor prognóstico da depleção de MM identificada pela US em amostra de pacientes críticos.
- Avaliar o valor prognóstico da piora da qualidade muscular identificada pela US em amostra de pacientes críticos.
- Avaliar o valor prognóstico da alteração de indicadores antropométricos em amostra de pacientes críticos.
- Avaliar a associação entre adequação da TN e depleção de MM em amostra de pacientes críticos.
- Avaliar a associação entre adequação da TN e alteração da qualidade muscular em amostra de pacientes críticos.
- Avaliar a associação entre depleção de MM avaliada pela US e antropometria durante a internação na UTI e parâmetros de função e força muscular na alta da UTI.
- Avaliar a associação entre perda de MM e adequação da TN durante a internação na UTI e QV 3 meses pós-alta da UTI.
- Avaliar o valor prognóstico do AF e da alteração desse parâmetro durante a internação na UTI.
- Avaliar o valor prognóstico da hiper-hidratação avaliada pelo BIVA em amostra de pacientes críticos.
- Avaliar a concordância entre o balanço hídrico cumulativo e BIVA mensurados durante a internação na UTI.

METODOLOGIA

Delineamento

Estudo de coorte prospectivo.

População e Amostra

A população será composta por pacientes admitidos em UTIs de quatro

hospitais pertencentes ao Complexo Hospitalar Santa Casa (Hospital Santa Clara, Pavilhão Pereira Filho, Dom Vicente Scherer e Santa Rita). Os critérios de inclusão serão pacientes adultos (≥ 18 anos), internados nas últimas 24 horas e em ventilação mecânica com previsão de permanência na UTI por pelo menos 72 horas, confirmada com equipe médica. Serão excluídos pacientes com doença renal em estágio terminal em diálise de longo prazo, grávidas, pacientes pós-cirurgia cardíacas eletiva, pacientes com amputação de pelo menos um membro (perna ou braço), pacientes incapazes de permanecerem em posição supina e pacientes com marca-passos ou desfibriladores metálicos implantados, devido à contraindicação para realização da BIA.

O cálculo do tamanho amostral foi baseado na alteração de parâmetros de interesse do presente estudo, em poder de 80% e nível de significância de 5%:

1. considerando-se alteração do AF entre primeiro e sétimo dia de internação na UTI identificada no estudo conduzido por Denneman e colaboradores⁴³ ($4,9 \pm 1,3$ versus $4,3 \pm 1,6$), o tamanho amostral estimado foi de 93 pacientes.

2. considerando-se a alteração da espessura do músculo do bíceps, antebraço e quadríceps, avaliada por US entre primeiro e décimo quarto dia de internação na UTI identificada no estudo conduzido por Wandrag e colaboradores²⁴ ($8,5 \pm 3,2$ versus $6,8 \pm 2,2$), o tamanho amostral estimado foi de 82 pacientes.

3. considerando-se a alteração do BIVA entre primeiro e sétimo dia de internação na UTI identificada no estudo conduzido por Denneman e colaboradores⁴³ ($81,5 \pm 7,1$ versus $78,9 \pm 6,2$), o tamanho amostral estimado foi de 104 pacientes.

Diante do exposto, e acrescentando 20% para potenciais perdas de seguimento e ajustes para covariáveis em modelo multivariado, o tamanho amostral previsto para o presente estudo é de 125 pacientes.

Protocolo do estudo

Serão selecionados os pacientes elegíveis a partir da lista de pacientes admitidos nas últimas 24 horas que antecederem a coleta de dados. Os pacientes serão incluídos no estudo mediante o consentimento para participação fornecido pelo familiar/responsável durante a visita ao paciente. Familiares assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido previamente à coleta de dados

(Apêndice 1). A ficha de coleta de dados encontra-se no **Apêndice II**.

Serão coletados os dados clínicos e sociodemográficos de prontuário eletrônico. O estado nutricional será avaliado nas primeiras 24 horas de admissão na UTI utilizando os critérios do *Global Leadership Initiative on Malnutrition* (GLIM). A avaliação de MM por US será realizada na admissão, no terceiro, quinto, sétimo e décimo quarto dia de internação na UTI, se permanecer internado por esse período. A avaliação antropométrica também será realizada na admissão, após sete e 14 dias da admissão na UTI e incluirá os parâmetros de CP, CB e EMAP. A bioimpedância será feita com o aparelho da marca *Biodynamics 450 E* na admissão, no terceiro, quinto, sétimo e décimo quarto dia e serão coletados os dados de resistência, reactância, ângulo de fase, água total, água intra e extracelular. Com os dados de resistência e reactância será calculado o BIVA. Força e função muscular serão avaliados na alta da UTI, utilizando os parâmetros de força do aperto de mão (FAM) e PFIT-s (*Physical Function in Intensive Care Test-scored*), respectivamente. A adequação da terapia nutricional será avaliada a partir da relação entre dieta prescrita e dieta infundida (fórmula, volume, calorias e proteína) nas duas primeiras semanas de internação. Após 3 meses da alta hospitalar os pacientes serão contatos via ligação telefônica para coleta dos desfechos de reinternação hospitalar, qualidade de vida (SF-36: Medical Outcomes Study 36-item Short-Form Health Survey) e óbito.

A seguir será detalhado como a coleta dos dados será realizada:

Dados sociodemográficos:

Características sociodemográficas serão coletadas no prontuário e incluem sexo, idade, etnia, estado civil, escolaridade e procedência. Quando não disponíveis no prontuário essas informações serão obtidas com o familiar.

Dados clínicos:

Serão coletados no prontuário eletrônico a data e motivo de internação hospitalar, bem como data e motivo de internação na UTI. Além da presença de comorbidades, exames laboratoriais (hemograma, proteína C reativa, albumina, creatinina, ureia, sódio, potássio), modo de ventilação mecânica e se realizado hemodiálise, qual método dialítico empregado (intermitente ou contínuo). Também serão coletados o tipo e a quantidade de fluido intravenoso administrado, uso de bloqueador neuromuscular e vasopressores. Dados de

pressão sistólica e diastólica, pressão arterial média (PAM), temperatura, frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), hemoglicose (HGT) serão coletados de prontuário eletrônico ou diretamente da folha de sinais das primeiras 24 horas de internação na UTI.

Também serão coletados os dados necessários para cálculo do APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*)⁸², SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*)⁸³ e SAPS 3 (*Simplified Acute Physiology Score III*)⁸⁴, que será realizado nos sites <http://www.medicinaintensiva.com.br> e <https://www.rccc.eu/ppc/indicadores/saps3.html>.

Avaliação nutricional:

1) Avaliação do estado nutricional para identificação de desnutrição: será realizada nas primeiras 24 horas de internação na UTI utilizando os critérios fenotípicos e etiológicos do *Global Leadership Initiative on Malnutrition (GLIM)*⁸⁵.

- Os critérios fenotípicos avaliados serão:

Perda de peso: >5% nos últimos 6 meses ou >10% por mais de 6 meses (Estágio 1: perda de peso >5%; Estágio 2: perda de peso >10%).

Índice de massa corporal (IMC): <20 kg/m² se <70 anos, ou <22 se ≥70 anos kg/m² (Estágio 1: < 70 anos e IMC <20 kg/m² ou ≥70 anos e IMC <22 kg/m², Estágio 2: <70 anos e IMC <18.5 kg/m² ou ≥ 70 anos e IMC <20 kg/m²).

Perda de massa muscular: Será avaliada pela espessura do músculo adutor do polegar (EMAP) e circunferência da panturrilha (CP), adotando os pontos de corte descritos na sessão de *Medidas Antropométricas*.

- Os critérios etiológicos avaliados serão:

Redução da ingestão alimentar ou assimilação comprometida: será realizada uma avaliação com base na porcentagem (100%, 75%, 50%, 25% ou 0%) relatada pelo familiar do consumo do paciente nas últimas duas semanas em comparação com a ingestão usual. A presença de condições gastrointestinais crônicas que afetam negativamente a assimilação ou absorção de alimentos (disfagia, náusea, vômito, câncer de estômago, pancreatite, síndrome do intestino curto) também será avaliada.

Inflamação: será determinada por valores de PCR >5 mg/dL.

2) Ultrassonografia:

Depleção de massa muscular será avaliada por ultrassonografia na admissão, no terceiro, quinto, sétimo e décimo quarto dia de internação na UTI naqueles pacientes que permanecerem internados por esse período. Será utilizado o ultrassom da marca *Vivid I - GE Healthcare* e o transdutor linear será utilizado como padrão. Os pacientes serão posicionados em decúbito dorsal, com joelhos estendidos e relaxados e pés apontando para o teto. O leito estará elevado entre 30 e 45° e o transdutor será aplicado formando um ângulo de 90° com a superfície da pele. As medidas serão aferidas no lado direito do corpo. Serão realizadas 3 medidas. Os locais de medição serão marcados com caneta de tinta permanente para garantir que a medida seja realizada sempre no mesmo local nos diferentes dias. Será utilizada a quantidade de gel necessária para garantir que o transdutor possa ser aplicado suavemente sobre a pele sem comprimir o músculo. A profundidade do transdutor será ajustada conforme necessário, a fim de obter uma imagem completa da espessura do músculo. As espessuras serão obtidas a partir de imagens congeladas, medindo a distância entre a margem superior do osso subjacente e o limite inferior da fáscia do músculo de interesse. O paciente será mantido com o joelho estendido e relaxado, serão identificados dois pontos entre espinha ilíaca ântero superior e pólo superior da patela: o ponto médio (1/2)⁸⁸ e 2/3⁸⁹ distais da espinha ilíaca ântero-superior. As espessuras do músculo reto femoral e do músculo vasto intermediário serão obtidas a partir da distância entre a margem superior e inferior de cada músculo. A área da secção transversal do reto femoral será calculada considerando o contorno lateral das bordas do músculo. A ecogenicidade do músculo reto femoral será avaliada a partir da análise quantitativa dos tons de cinza e será relatada em pixels.

3) Medidas antropométricas:

Depleção de massa muscular e massa corporal total será avaliada por medidas antropométricas na admissão, no sétimo e no décimo quarto dia de internação na UTI. Todas as medidas serão realizadas do lado direito do corpo, seguindo as orientações do *Anthropometric Standardization Reference Manual*. Se não for possível devido a presença de acessos ou curativos, a medida será realizada do lado esquerdo.

- Circunferência da panturrilha (CP): a medida será aferida com fita métrica inextensível no perímetro máximo, em centímetros, do músculo da panturrilha. Serão adotados os pontos de corte de ≤ 33 cm para mulheres e ≤ 34 cm para homens para classificação de perda de massa muscular⁹⁰.

- Circunferência do braço (CB): a medida será realizada com fita métrica inextensível, no perímetro localizado no ponto médio entre o acrômio e o olecrano, em centímetros. Será calculado o percentual de adequação da CB⁹¹.

$$\text{Adequação CB} = \text{CB obtida (cm)} \times 100 / \text{CB percentil 50}$$

- Espessura do músculo adutor do polegar (EMAP): será aferida na mão dominante, com indivíduo deitado, cotovelo formando um ângulo de aproximadamente 90° e a mão apoiada sob o abdômen. O plicômetro da marca *Lange®* será aplicado no vértice do triângulo imaginário formado entre polegar estendido e dedo indicador. Serão realizadas três medidas e calculado a média, e utilizados os pontos de corte propostos pela Gonzalez e colaboradores para classificação de massa muscular reduzida pelo EMAP⁹².

- Altura do joelho (AJ): será medida com fita métrica inextensível a distância, em centímetros, entre a cabeça da fíbula e a base do calcânhar.

As medidas antropométricas não serão aferidas na presença de edema.

4) Bioimpedância:

A bioimpedância será feita com aparelho da marca *Byodynamics 450E*, na admissão, no terceiro, quinto, sétimo e décimo quarto dia, com o paciente deitado em posição supina por 10 minutos antes da aferição, braços distanciados a 30° e pernas a 45°. Serão posicionados quatro eletrodos adesivos descartáveis do lado direito do corpo, sob a pele limpa com etanol 70% e seca. Os eletrodos distais serão fixados na mão, próximo à articulação metacarpo-falangea da superfície dorsal e no pé, no arco transversal da superfície superior. Os eletrodos proximais serão posicionados no pulso, entre as proeminências distais do rádio e da ulna e no tornozelo, entre os maléolos medial e lateral³⁰. Será utilizada frequência de 50-kHz liberada pelos eletrodos. A partir da geração da corrente elétrica, serão fornecidos dados de reactância e resistência, que serão utilizados para cálculo do vetor de bioimpedância elétrica (BIVA). Serão extraídos ainda dados de AF, água

corporal total, água intra e extracelular.

O BIVA será determinado a partir da construção de um gráfico em software específico⁹³, com valor de resistência no eixo X e reactância no eixo Y, ambos dados divididos pela altura. O gráfico terá três elipses cruzando os eixos X e Y, sendo que cada elipse representa os percentis 50º, 75º e 95º. Pacientes com valores de BIVA > percentil 75º serão considerados hiper-hidratados, e aqueles com percentil entre 50º e 75º serão classificados com hidratação normal⁹⁴.

5) *Terapia Nutricional:*

Serão coletadas de prontuário eletrônico as necessidades nutricionais de caloria e proteína, bem como a prescrição nutricional. A quantidade de dieta infundida será obtida a partir da folha de sinais. Será calculado o percentual de adequação da dieta, a partir da seguinte fórmula:

% de adequação da TN: volume administrado de dieta/volume prescrito de dieta

x 100 % de adequação de caloria: calorias administradas/calorias prescritas x 100

% de adequação de proteína: proteínas administradas/proteínas prescritas x 100

Essa avaliação será feita nos primeiros 14 dias de internação na UTI para pacientes que permanecerem internados por esse período.

6) *Avaliação da força muscular:*

A força do aperto de mão (FAM) será realizada na alta da UTI usando o dinamômetro *Sahean* com o paciente deitado em posição supina. A medida será aferida na mão não dominante, o paciente será orientado a apertar com sua força máxima. Os pacientes realizarão a medidas 3 vezes, com 60 segundos de descanso, e será utilizado o maior valor. Serão utilizados os pontos de corte < 11kg para homens e < 7kg para mulheres, propostos especialmente para pacientes críticos⁹⁵.

7) *Avaliação de função muscular:*

A função muscular será avaliada na alta da UTI pelo teste PFIT-s (*Physical Function in Intensive Care Test-scored*)⁹⁶, que avalia 4 parâmetros:

1) Nível de assistência da posição sentada para em pé: o paciente estará sentado na poltrona e será orientado a levantar. Será avaliado se nenhuma, 1 ou 2 pessoas serão necessárias para que o paciente permaneça em pé.

2) Cadência da marcha no lugar: o paciente será orientado a marchar no lugar, com ou sem apoio, conforme necessário. Será registrado o tempo e o número de passos realizados. Cada vez que o paciente fixa o pé no chão será contabilizado como um passo. Se o paciente não conseguir caminhar por mais de 2 segundos o teste encerra. Se o paciente for apto a caminhar por mais de 3 minutos recebe a pontuação máxima, independente da cadência da marcha.

3) Força muscular flexora de ombro: será avaliada com o paciente sentado ou deitado. O paciente será orientado a levantar o braço até o nível do ombro. Se o paciente for capaz de levantar o braço, o avaliador aplicará resistência leve com a mão logo acima do cotovelo. O paciente será orientado a manter o braço estendido na altura do ombro. A força será avaliada de acordo com a Escala de Classificação de Oxford, que varia de 0 – nenhuma contração muscular visível ou palpável, até 5 – potência normal.

4) Força muscular extensora do joelho: será avaliada com o paciente sentado ou deitado. Será orientado que o paciente estenda o joelho. Se o paciente for capaz de estender o joelho, o avaliador aplicará resistência leve próximo ao tornozelo. O paciente será orientado a manter a perna estendida. A força será avaliada de acordo com a Escala de Classificação de Oxford, que varia de 0 – nenhuma contração muscular visível ou palpável, até 5 – potência normal.

O escore de pontuação está detalhadamente descrito no Apêndice III.

8) *Qualidade de vida:*

A qualidade de vida será avaliada 3 meses após alta hospitalar por ligação telefônica a partir do questionário *Medical Outcomes Study 36-Item Short Form Health Survey (SF-36)*⁹⁷. A pontuação varia de 0 a 100, sendo que mais próximo de 0 pior a QV. O questionário é composto por 8 subitens, que estão descritos a seguir:

1) Capacidade funcional: avalia a presença e a extensão de limitações relacionadas à capacidade física;

2) Aspectos físicos: avalia limitações quanto ao tipo e a qualidade de trabalho, bem como o quanto essas limitações dificultam a realização do trabalho e das atividades da vida diária;

3) Dor: avalia a presença de dor, sua intensidade e sua interferência nas atividades

da vida diária;

4) Estado geral de saúde: avalia como o paciente se sente em relação a sua saúde global;

5) Vitalidade: itens que consideram o nível de energia e de fadiga; 6) Aspectos sociais: analisa a integração do indivíduo em atividades sociais; 7) Aspectos emocionais: avalia o impacto de aspectos psicológicos no bem-estar do paciente; 8) Saúde mental: inclui questões sobre ansiedade, depressão, alterações no comportamento ou descontrole emocional, assim como o bem-estar psicológico.

O esquema de pontuação e classificação da ferramenta está detalhadamente descrito no Apêndice IV.

Desfechos de interesse:

O prontuário dos pacientes será revisado durante todo o período de internação no hospital. Serão verificados o tempo de utilização de VM, tempo de internação na UTI, tempo de internação hospitalar e óbito intra-hospitalar. Após 3 meses, os pacientes serão contatos via ligação telefônica para a coleta dos desfechos de reinternação hospitalar, qualidade de vida e óbito.

ANÁLISE DOS DADOS

Serão calculadas as estatísticas descritivas média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartil para as variáveis quantitativas e frequência absoluta e relativa para as categóricas. A normalidade das variáveis quantitativas será testada por Kolmogorov-Smirnov.

A alteração dos parâmetros nutricionais durante a internação na UTI será analisada por meio de *General Estimated Equations (GEE)*.

O delta de cada parâmetro será calculado a partir da diferença dos valores finais e iniciais e os valores comparados entre os pacientes agrupados de acordo com os desfechos de interesse (sobreviventes x não sobreviventes, internação prolongada e não prolongada).

O valor prognóstico da alteração dos parâmetros nutricionais será analisado por regressão logística, considerando-se os desfechos internação na UTI e hospitalar prolongada (categorizados pela mediana), readmissão e óbito em 3 meses e por regressão de Cox para o desfecho morte na UTI e intra-hospitalar.

A análise dos dados será realizada no SPSS versão 22.0 e valores de $P < 0.05$ serão considerados significativos.

ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto será apresentado para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, e somente será iniciado após sua aprovação. Os participantes envolvidos podem experimentar algum grau de desconforto no momento da avaliação nutricional (aferição das medidas antropométricas, realização de bioimpedância e ultrassonografia, FAM, PFIT-s) e para responder o questionário de qualidade de vida (SF-36). Os familiares poderão se sentir desconfortáveis para responder dados sobre peso e ingestão alimentar prévia do paciente. Os participantes que desejarem se retirar da pesquisa poderão fazer em qualquer momento. Os dados pessoais serão mantidos em sigilo e todo material obtido será utilizado de forma anônima. O termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice I) será apresentado em duas vias e será entregue uma via ao familiar do paciente após a assinatura. Os dados serão utilizados somente para pesquisa e armazenados por, no máximo, cinco anos, após isso, serão destruídos. Os pacientes identificados com depleção de massa muscular, hiper-hidratação e redução de força e função muscular serão sinalizados para a equipe multiprofissional (nutrição, fisioterapia, medicina e enfermagem). A pesquisa será realizada de acordo com os pressupostos éticos dispostos na Resolução 466/12

(http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html)

e Resolução 580/18

(<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2018/Reso580.pdf>).

CRONOGRAMA

A previsão da conclusão do presente projeto de pesquisa é de 15 meses, conforme detalhado a seguir:

	1 - 3 meses	4 - 7 meses	8 – 11 meses	12 – 15 meses
Apreciação ética	X			
Coleta de dados		X	X	
Análise de dados			X	
Divulgação dos dados				X

ORÇAMENTO

O orçamento do presente projeto está discriminado abaixo e será de inteira responsabilidade dos pesquisadores.

Material	Justificativa	Quantidade	Preço unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Ultrassom ¹	Avaliação de massa muscular	1	-	-
Bioimpedância ²	Avaliação de AF e BIVA	1	-	-
Eletrodos	Para uso na BIA	2500	1,22	3.050
Dinamômetro ³	Aferição da FAM	1	-	-
Plicômetro Lange ³	Aferição do EMAP	1	-	-
Folhas	Impressão de fichas de coleta e TCLE	500	0,04	20
Valor total	3.070			

¹disponível no hospital; ²disponível na UFCSPA; ³posse dos pesquisadores.

REFERENCIAS

1. Joskova V, Patkova A, Havel E, et al. Critical evaluation of muscle mass loss as a prognostic marker of morbidity in critically ill patients and methods for its determination. *J Rehabil Med*. 2018;50(8):696-704. doi:10.2340/16501977-2368
2. Porter C, Tompkins RG, Finnerty CC, Sidossis LS, Suman OE, Herndon DN. The metabolic stress response to burn trauma: current understanding and therapies. *Lancet*. 2016;388(10052):1417-1426. doi:10.1016/S0140-6736(16)31469-6
3. Fischer M, JeVenn A, Hipkind P. Evaluation of muscle and fat loss as diagnostic criteria for malnutrition. *Nutr Clin Pract*. 2015;30(2):239-248. doi:10.1177/0884533615573053
4. Mourtzakis M, Parry S, Connolly B, Puthuchear Z. Skeletal Muscle Ultrasound in Critical Care: A Tool in Need of Translation. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(10):1495-1503. doi: 10.1513/AnnalsATS.201612-967PS
5. Griffith DM, Vale ME, Campbell C, Lewis S, Walsh TS. Persistent inflammation and recovery after intensive care: A systematic review. *J Crit Care*. 2016;33:192-199. doi:10.1016/j.jcrc.2016.01.011
6. Brower RG. Consequences of bed rest. *Crit Care Med*. 2009;37(10 Suppl):S422- S428. doi:10.1097/CCM.0b013e3181b6e30a
7. Parry SM, Puthuchear ZA. The impact of extended bed rest on the musculoskeletal system in the critical care environment. *Extrem Physiol Med*. 2015; 4:16. Published 2015 Oct 9. doi:10.1186/s13728-015-0036-7
8. Parry SM, El-Ansary D, Cartwright MS, et al. Ultrasonography in the intensive care setting can be used to detect changes in the quality and quantity of muscle and is related to muscle strength and function. *J Crit Care*. 2015;30(5): 1151.e 9- 1151.e1.151E14. doi: 10.1016/j.jcrc.2015.05.024
9. Puthuchear ZA, Rawal J, McPhail M, et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness [published correction appears in *JAMA*. 2014 Feb 12;311(6):625. Padhke, Rahul [corrected to Phadke, Rahul]]. *JAMA*. 2013;310(15):1591-1600. doi:10.1001/jama.2013.278481

10. Woo HY, Oh SY, Lee H, Ryu HG. Evaluation of the association between decreased skeletal muscle mass and extubation failure after long-term mechanical ventilation. *Clin Nutr.* 2020;39(9):2764-2770. doi:10.1016/j.clnu.2019.12.0027
11. Xi F, Tan S, Gao T, et al. Low skeletal muscle mass predicts poor clinical outcomes in patients with abdominal trauma [published online ahead of print, 2021 Mar 4]. *Nutrition.* 2021;89:111229. doi:10.1016/j.nut.2021.111229
12. Gruther W, Benesch T, Zorn C, et al. Muscle wasting in intensive care patients: ultrasound observation of the M. quadriceps femoris muscle layer. *J Rehabil Med.* 2008;40(3):185-189. doi:10.2340/16501977-0139
13. Ng CC, Lee ZY, Chan WY, et al. Low Muscularity as Assessed by Abdominal Computed Tomography on Intensive Care Unit Admission Is Associated With Mortality in a Critically Ill Asian Population. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2020;44(3):425-433. doi:10.1002/jpen.1666
14. Moisey LL, Mourtzakis M, Cotton BA, et al. Skeletal muscle predicts ventilator free days, ICU-free days, and mortality in elderly ICU patients. *Crit Care.* 2013;17(5):R206. Published 2013 Sep 19. doi:10.1186/cc12901
15. Ju S, Choi SM, Park YS, et al. Rapid Muscle Loss Negatively Impacts Survival in Critically Ill Patients With Cirrhosis. *J Intensive Care Med.* 2020;35(7):663- 671. doi:10.1177/0885066618775706
16. Looijaard WGPM, Molinger J, Weijs PJM. Measuring and monitoring lean body mass in critical illness. *Curr Opin Crit Care.* 2018;24(4):241-247. doi:10.1097/MCC.0000000000000511
17. Mundi MS, Patel JJ, Martindale R. Body Composition Technology: Implications for the ICU. *Nutr Clin Pract.* 2019;34(1):48-58. doi:10.1002/ncp.10230
18. Hadda V, Kumar R, Hussain T, et al. Reliability of ultrasonographic arm muscle thickness measurement by various levels of health care providers in ICU. *Clin Nutr ESPEN.* 2018;24:78-81. doi:10.1016/j.clnesp.2018.01.009
19. Tillquist M, Kutsogiannis DJ, Wischmeyer PE, et al. Bedside ultrasound is a practical and reliable measurement tool for assessing quadriceps

- muscle layer thickness. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2014;38(7):886-890. doi:10.1177/0148607113501327
20. Abe T, Fujita E, Thiebaud RS, Loenneke JP, Akamine T. Ultrasound-Derived Forearm Muscle Thickness Is a Powerful Predictor for Estimating DXA-Derived Appendicular Lean Mass in Japanese Older Adults. *Ultrasound Med Biol.* 2016;42(9):2341-2344. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2016.05.008
 21. Lambell KJ, Tierney AC, Wang JC, et al. Comparison of Ultrasound-Derived Muscle Thickness With Computed Tomography Muscle Cross-Sectional Area on Admission to the Intensive Care Unit: A Pilot Cross-Sectional Study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2021;45(1):136-145. doi:10.1002/jpen.1822
 22. Puthucherry ZA, Phadke R, Rawal J, et al. Qualitative Ultrasound in Acute Critical Illness Muscle Wasting. *Crit Care Med.* 2015;43(8):1603-1611. doi:10.1097/CCM.0000000000001016
 23. Harris-Love MO, Seamon BA, Teixeira C, Ismail C. Ultrasound estimates of muscle quality in older adults: reliability and comparison of Photoshop and ImageJ for the grayscale analysis of muscle echogenicity. *PeerJ.* 2016;4: e1721. Published 2016 Feb 22. doi:10.7717/peerj.1721
 24. Wandrag L, Brett SJ, Frost GS, Bountziouka V, Hickson M. Exploration of muscle loss and metabolic state during prolonged critical illness: Implications for intervention? *PLoS One.* 2019;14(11): e0224565. Published 2019 Nov 14. doi: 10.1371/journal.pone.0224565
 25. Twose P, Jones U, Wise MP. Effect of hypercapnia on respiratory and peripheral skeletal muscle loss during critical illness - A pilot study. *J Crit Care.* 2018; 45:105-109. doi:10.1016/j.jcrc.2018.02.002
 26. Toledo DO, Freitas BJ, Dib R, et al. Peripheral muscular ultrasound as outcome assessment tool in critically ill patients on mechanical ventilation: An observational cohort study. *Clin Nutr ESPEN.* 2021; 43:408-414. doi: 10.1016/j.clnesp.2021.03.015
 27. Paris MT, Mourtzakis M, Day A, et al. Validation of Bedside Ultrasound of Muscle Layer Thickness of the Quadriceps in the Critically Ill Patient (VALIDUM Study). *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2017;41(2):171-180. doi:10.1177/0148607116637852

28. Parry SM, El-Ansary D, Cartwright MS, et al. Ultrasonography in the intensive care setting can be used to detect changes in the quality and quantity of muscle and is related to muscle strength and function. *J Crit Care.* 2015;30(5):1151.e9-1151.e1.151E14. doi:10.1016/j.jcrc.2015.05.024
29. Fetterplace K, Deane AM, Tierney A, et al. Targeted Full Energy and Protein Delivery in Critically Ill Patients: A Pilot Randomized Controlled Trial (FEED Trial). *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2018;42(8):1252-1262. doi:10.1002/jpen.1166
30. Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, et al. Bioelectrical impedance analysis part I: review of principles and methods. *Clin Nutr.* 2004;23(5):1226-1243. doi:10.1016/j.clnu.2004.06.004
31. Moonen HPFX, Van Zanten ARH. Bioelectric impedance analysis for body composition measurement and other potential clinical applications in critical illness. *Curr Opin Crit Care.* 2021;27(4):344-353. doi:10.1097/MCC.0000000000000840
32. Savalle M, Gillaizeau F, Maruani G, et al. Assessment of body cell mass at bedside in critically ill patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(3):E389-E396. doi:10.1152/ajpendo.00502.2011
33. Thibault R, Makhoulf AM, Mulliez A, et al. Fat-free mass at admission predicts 28-day mortality in intensive care unit patients: the international prospective observational study Phase Angle Project. *Intensive Care Med.* 2016;42(9):1445-1453. doi:10.1007/s00134-016-4468-3
34. da Silva TK, Berbigier MC, Rubin Bde A, Moraes RB, Corrêa Souza G, Schweigert Perry ID. Phase angle as a prognostic marker in patients with critical illness. *Nutr Clin Pract.* 2015;30(2):261-265. doi:10.1177/0884533615572150
35. Razzera EL, Marcadenti A, Rovedder SW, Alves FD, Fink JDS, Silva FM. Parameters of Bioelectrical Impedance Are Good Predictors of Nutrition Risk, Length of Stay, and Mortality in Critically Ill Patients: A Prospective Cohort Study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2020;44(5):849-854.
36. Yao J, Zhou M, Xu B, Li C, Chen H, Gong D. The association of bioimpedance analysis parameters with the outcomes of critically ill

- patients. Clin Nutr. 2020;39(9):2848-2855. doi:10.1016/j.clnu.2019.12.018
37. Jansen AK, Gattermann T, da Silva Fink J, et al. Low standardized phase angle predicts prolonged hospitalization in critically ill patients. Clin Nutr ESPEN. 2019;34:68-72. doi:10.1016/j.clnesp.2019.08.011
 38. Looijaard WGPM, Stapel SN, Dekker IM, et al. Identifying critically ill patients with low muscle mass: Agreement between bioelectrical impedance analysis and computed tomography. Clin Nutr. 2020;39(6):1809-1817. doi:10.1016/j.clnu.2019.07.020
 39. Kuchnia A, Earthman C, Teigen L, et al. Evaluation of Bioelectrical Impedance Analysis in Critically Ill Patients: Results of a Multicenter Prospective Study. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2017;41(7):1131-1138. doi:10.1177/0148607116651063
 40. do Amaral Paes TC, de Oliveira KCC, de Carvalho Padilha P, Peres WAF. Phase angle assessment in critically ill cancer patients: Relationship with the nutritional status, prognostic factors and death. J Crit Care. 2018;44:430-435. doi:10.1016/j.jcrc.2018.01.006
 41. Ko SJ, Cho J, Choi SM, et al. Phase Angle and Frailty Are Important Prognostic Factors in Critically Ill Medical Patients: A Prospective Cohort Study. J Nutr Health Aging. 2021;25(2):218-223. doi:10.1007/s12603-020-1487-0
 42. Stapel SN, Looijaard WGPM, Dekker IM, Girbes ARJ, Weijs PJM, Oudemans van Straaten HM. Bioelectrical impedance analysis-derived phase angle at admission as a predictor of 90-day mortality in intensive care patients. Eur J Clin Nutr. 2018;72(7):1019-1025. doi:10.1038/s41430-018-0167-1
 43. Denneman N, Hessels L, Broens B, et al. Fluid balance and phase angle as assessed by bioelectrical impedance analysis in critically ill patients: a multicenter prospective cohort study. Eur J Clin Nutr. 2020;74(10):1410-1419. doi:10.1038/s41430-020-0622-7
 44. Ellegård LH, Petersen P, Öhrn L, Bosaeus I. Longitudinal changes in phase angle by bioimpedance in intensive care patients differ between survivors and non-survivors. Clin Nutr ESPEN. 2018;24:170-172. doi:10.1016/j.clnesp.2018.02.001

45. Gonzalez-Granda A, Schollenberger A, Haap M, Riessen R, Bischoff SC. Optimization of Nutrition Therapy with the Use of Calorimetry to Determine and Control Energy Needs in Mechanically Ventilated Critically Ill Patients: The ONCA Study, a Randomized, Prospective Pilot Study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2019;43(4):481-489. doi:10.1002/jpen.1450
46. Bragagnolo R, Caporossi FS, Caporossi C, Dock-Nascimento DB, Aguilar Nascimento JE. Handgrip strength and adductor pollicis muscle thickness as predictors of postoperative complications after major operations of the gastrointestinal tract. *Eur e-Journal Clin Nutr Metabolism.* 2011;6:21-6. doi: 10.1016/j.eclnm.2010.12.003.
47. LeongShu-Fen C, Ong V, Kowitlawakul Y, Ling TA, Mukhopadhyay A, Henry J. The adductor pollicis muscle: a poor predictor of clinical outcome in ICU patients. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2015;24(4):605-9. doi: 10.6133/apjcn.2015.24.4.22
48. Caporossi FS, Caporossi C, Borges Dock-Nascimento D, de Aguilar Nascimento JE. Measurement of the thickness of the adductor pollicis muscle as a predictor of outcome in critically ill patients. *Nutr Hosp.* 2012;27(2):490-495. doi:10.1590/S0212-16112012000200021
49. Ghorabi S, Ardehali H, Amiri Z, Vahdat Shariatpanahi Z. Association of the Adductor Pollicis Muscle Thickness With Clinical Outcomes in Intensive Care Unit Patients. *Nutr Clin Pract.* 2016;31(4):523-526. doi:10.1177/0884533615621547
50. Hejazi N, Mazloom Z, Zand F, Rezaianzadeh A, Amini A. Nutritional Assessment in Critically Ill Patients. *Iran J Med Sci.* 2016;41(3):171-179.
51. Nematy M, Mohajeri SAR, Moghadam SA, Safarian M, Norouzy A, Parizadeh S MR et al. (2011). Nutritional status in intensive care unit patients: a prospective clinical cohort pilot study. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 5(2), 163–168. doi:10.1007/s12349-011-0071-x
52. Rodrigues CN, Ribeiro Henrique J, Ferreira ÁRS, Correia MITD. Ultrasonography and Other Nutrition Assessment Methods to Monitor the Nutrition Status of Critically Ill Patients [published online ahead of print, 2020 Jul 22]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2020;10.1002/jpen.1966.

doi:10.1002/jpen.1966

53. Vanhorebeek I, Latronico N, Van den Berghe G. ICU-acquired weakness. *Intensive Care Med.* 2020;46(4):637-653. doi:10.1007/s00134-020-05944-4
54. Fan E, Cheek F, Chlan L, et al. An official American Thoracic Society Clinical Practice guideline: the diagnosis of intensive care unit-acquired weakness in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(12):1437-1446. doi:10.1164/rccm.201411-2011ST
55. Puthucherry Z, Montgomery H, Moxham J, Harridge S, Hart N. Structure to function: muscle failure in critically ill patients. *J Physiol.* 2010;588(Pt 23):4641-4648. doi:10.1113/jphysiol.2010.197632
56. Parry SM, Granger CL, Berney S, et al. Assessment of impairment and activity limitations in the critically ill: a systematic review of measurement instruments and their clinimetric properties. *Intensive Care Med.* 2015;41(5):744-762. doi:10.1007/s00134-015-3672-x
57. Parry SM, El-Ansary D, Cartwright MS, et al. Ultrasonography in the intensive care setting can be used to detect changes in the quality and quantity of muscle and is related to muscle strength and function. *J Crit Care.* 2015;30(5): 1151.e9- 1151.e1.151E14. doi: 10.1016/j.jcrc.2015.05.024
58. Gerth AMJ, Hatch RA, Young JD, Watkinson PJ. Changes in health-related quality of life after discharge from an intensive care unit: a systematic review. *Anaesthesia.* 2019;74(1):100-108. doi:10.1111/anae.14444
59. Cuthbertson BH, Scott J, Strachan M, Kilonzo M, Vale L. Quality of life before and after intensive care. *Anaesthesia.* 2005;60(4):332-339. doi:10.1111/j.1365- 2044.2004.04109.x
60. Ciconelli RM, Ferraz MB: Brazilian Portuguese version of the SF-36. A reliable and valid quality of life outcome measure. *Rev Bras Reumatol,* 1999, 39: 143– 150.
61. Chrispin PS, Scotton H, Rogers J, et al.: Short Form 36 in the intensive care unit: assessment of acceptability, reliability and validity of the questionnaire. *Anaesthesia,* 1997, 52: 15–23.
62. Malbrain MLNG, Van Regenmortel N, Saugel B, et al. Principles of fluid

- management and stewardship in septic shock: it is time to consider the four D's and the four phases of fluid therapy. *Ann Intensive Care*. 2018;8(1):66. Published 2018 May 22. doi:10.1186/s13613-018-0402-x
63. Seccombe A, Sapey E. What is the evidence base for fluid resuscitation in acute medicine? *Clin Med (Lond)*. 2018;18(3):225-230. doi:10.7861/clinmedicine.18-3-225
 64. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017;43(3):304-377. doi:10.1007/s00134-017-4683-6
 65. O'Connor ME, Prowle JR. Fluid Overload. *Crit Care Clin*. 2015;31(4):803-821. doi: 10.1016/j.ccc.2015.06.013
 66. Sakr Y, Rubatto Birri PN, Kotfis K, et al. Higher Fluid Balance Increases the Risk of Death From Sepsis: Results From a Large International Audit. *Crit Care Med*. 2017;45(3):386-394. doi:10.1097/CCM.0000000000002189
 67. de Almeida JP, Palomba H, Galas FR, et al. Positive fluid balance is associated with reduced survival in critically ill patients with cancer. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56(6):712-717. doi:10.1111/j.1399-6576.2012.02717.x
 68. Messmer AS, Zingg C, Müller M, Gerber JL, Schefold JC, Pfortmueller CA. Fluid Overload and Mortality in Adult Critical Care Patients-A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Crit Care Med*. 2020;48(12):1862-1870. doi:10.1097/CCM.0000000000004617
 69. Tigabu BM, Davari M, Kebriaeezadeh A, Mojtahedzadeh M. Fluid volume, fluid balance and patient outcome in severe sepsis and septic shock: A systematic review. *J Crit Care*. 2018;48:153-159. doi:10.1016/j.jcrc.2018.08.018
 70. Vaara ST, Korhonen AM, Kaukonen KM, et al. Fluid overload is associated with an increased risk for 90-day mortality in critically ill patients with renal replacement therapy: data from the prospective FINNAKI study. *Crit Care*. 2012;16(5):R197. Published 2012 Oct 17. doi:10.1186/cc11682

71. Bouchard J, Soroko SB, Chertow GM, Himmelfarb J, Ikizler TA, Paganini EP, Mehta RL. Fluid accumulation, survival and recovery of kidney function in critically ill patients with acute kidney injury. *Kidney Int.* 2009;**16**:422–427. doi: 10.1038/ki.2009.159.
72. Perren A, Markmann M, Merlani G, Marone C, Merlani P. Fluid balance in critically ill patients. Should we really rely on it?. *Minerva Anesthesiol.* 2011;**77**(8):802-811.
73. Schneider AG, Baldwin I, Freitag E, Glassford N, Bellomo R. Estimation of fluid status changes in critically ill patients: fluid balance chart or electronic bed weight?. *J Crit Care.* 2012;**27**(6):. doi: 10.1016/j.jcrc.2011.12.017
74. Stevenson LW, Perloff JK. The limited reliability of physical signs for estimating hemodynamics in chronic heart failure. *JAMA.* 1989;**261**(6):884-888.
75. Prowle JR, Kirwan CJ, Bellomo R. Fluid management for the prevention and attenuation of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2014;**10**(1):37-47. doi:10.1038/nrneph.2013.232
76. Santarelli S, Russo V, Lalle I, et al. Prognostic value of decreased peripheral congestion detected by Bioelectrical Impedance Vector Analysis (BIVA) in patients hospitalized for acute heart failure: BIVA prognostic value in acute heart failure. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2017;**6**(4):339-347. doi:10.1177/2048872616641281
77. Hise ACDR, Gonzalez MC. Assessment of hydration status using bioelectrical impedance vector analysis in critical patients with acute kidney injury. *Clin Nutr.* 2018;**37**(2):695-700. doi:10.1016/j.clnu.2017.02.016
78. Peacock IV WF. Use of bioimpedance vector analysis in critically ill and cardiorenal patients. *Contrib Nephrol.* 2010;**165**:226-235. doi:10.1159/000313762
79. Basso F, Berdin G, Virzì GM, et al. Fluid management in the intensive care unit: bioelectrical impedance vector analysis as a tool to assess hydration status and optimal fluid balance in critically ill patients. *Blood Purif.* 2013;**36**(3-4):192- 199. doi:10.1159/000356366
80. Jones SL, Tanaka A, Eastwood GM, et al. Bioelectrical impedance vector

- analysis in critically ill patients: a prospective, clinician-blinded investigation. *Crit Care*. 2015;19(1):290. Published 2015 Aug 12. doi:10.1186/s13054-015-1009-3
81. Samoni S, Vigo V, Reséndiz LI, et al. Impact of hyperhydration on the mortality risk in critically ill patients admitted in intensive care units: comparison between bioelectrical impedance vector analysis and cumulative fluid balance recording. *Crit Care*. 2016;20:95. Published 2016 Apr 8. doi:10.1186/s13054-016-1269-6
 82. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13(10):818-829.
 83. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707-710. doi:10.1007/BF01709751
 84. Moreno RP, Metnitz PG, Almeida E, et al. SAPS 3--From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 2: Development of a prognostic model for hospital mortality at ICU admission [published correction appears in *Intensive Care Med*. 2006 May;32(5):796]. *Intensive Care Med*. 2005;31(10):1345-1355. doi:10.1007/s00134-005-2763-5.
 85. Cederholm T, Jensen GL, Correia MITD, et al. GLIM criteria for the diagnosis of malnutrition - A consensus report from the global clinical nutrition community. *Clin Nutr*. 2019;38(1):1-9. doi:10.1016/j.clnu.2018.08.002
 86. Chumlea WC, Guo S, Roche AF, Steinbaugh ML. Prediction of body weight for the nonambulatory elderly from anthropometry. *J Am Diet Assoc*. 1988;88(5):564-568.
 87. Chumlea WC, Roche AF, Steinbaugh ML. Estimating stature from knee height for persons 60 to 90 years of age. *J Am Geriatr Soc*. 1985;33(2):116-120. doi:10.1111/j.1532-5415.1985.tb02276.x
 88. Reid CL, Campbell IT, Little RA. Muscle wasting and energy balance in critical illness. *Clin Nutr*. 2004;23(2):273-280. doi:10.1016/S0261-

89. Bury C, DeChicco R, Nowak D, et al. Use of Bedside Ultrasound to Assess Muscle Changes in the Critically Ill Surgical Patient. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2021;45(2):394-402. doi:10.1002/jpen.1840
90. Barbosa-Silva TG, Bielemann RM, Gonzalez MC, Menezes AM. Prevalence of sarcopenia among community-dwelling elderly of a medium-sized South American city: results of the COMO VAI? study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016; 7(2): 136-43. doi: 10.1002/jcsm.12049.
91. Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessments of growth and nutritional status. University of Michigan, 1990. 189p.
92. Barbosa-Silva MC, Barros AJ, Wang J, Heymsfield SB, Pierson Jr RN. Bioelectrical impedance analysis: population reference values for phase angle by age and sex. *Am J Clin Nutr* 2005;82(1):49e52. <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.1.49>
93. Piccoli A, Pastori G. BIVA software. Padova: Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padova, Italy; 2002. http://www.renalgate.it/formule_calcolatori/BIVAGuide.pdf.
94. Kammar-García A, Pérez-Morales Z, Castillo-Martinez L, et al. Mortality in adult patients with fluid overload evaluated by BIVA upon admission to the emergency department. *Postgrad Med J.* 2018;94(1113):386-391. doi:10.1136/postgradmedj-2018-135695
95. Ali NA, O'Brien JM Jr, Hoffmann SP, et al. Acquired weakness, handgrip strength, and mortality in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(3):261-268. doi:10.1164/rccm.200712-1829OC
96. Silva VZ, Lima AS, Nadiele, H, et al. Versão Brasileira do teste da Função Física em Unidades de Terapia Intensiva e do De Morton Mobility Index: tradução e adaptação transcultural e propriedades clinimétricas. *Jornal Brasileiro De Pneumologia,* 46. 2020;46(4):e20180366. doi.org/10.36416/1806- 3756/e20180366.
97. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev Bras Reumatol.* 1999;39(3):143- 150.

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação de parâmetros de massa muscular e de hidratação durante a internação na UTI e associação com desfechos clínicos: um estudo de coorte prospectivo

A perda de massa muscular e a presença de hiper-hidratação (excesso de água no acumulada no corpo) são comuns em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Essas condições estão associadas com maior tempo de internação hospitalar e na UTI, maior tempo de uso de ventilação mecânica e maior risco de morte. Porém, ainda é preciso estudar qual a melhor forma de identificar corretamente os pacientes com perda de massa muscular e hiper-hidratação. Recentemente, estudos se propuseram a avaliar perda de massa muscular durante os primeiros dias de internação na UTI utilizando o ultrassom. É uma forma rápida, acessível, de baixo custo e sem risco ao paciente, pois é um exame de imagem no qual o avaliador encosta o aparelho na coxa do paciente e consegue ver o músculo na tela do computador. Porém ainda são necessários mais estudos para a padronização do método e finalmente sua incorporação na prática hospitalar. Em relação à avaliação da hiper-hidratação, também existem estudos com o objetivo de avaliar o uso de bioimpedância elétrica, por ser um método simples e não invasivo, mas que ainda requer investigação. Esse também é um método que não traz risco ao paciente. O avaliador coloca dois eletrodos no pé e dois eletrodos na mão do paciente (os mesmos que se utiliza para fazer o eletrocardiograma - exame do coração), e o aparelho faz a passagem de uma corrente elétrica que permite avaliar quanta água o paciente está acumulando e quanto ele tem de músculo e de gordura.

Como seu familiar, _____, está internado na UTI e está sem condições de conversar nesse momento por estar em ventilação mecânica (com o tubo que o auxilia a respirar), você está sendo convidado a autorizar que ele participe de uma pesquisa realizada pela Universidade Federal de Ciências da Saúde em parceria com o Complexo Hospitalar Irmandade de Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, intitulada: “Avaliação de parâmetros de massa muscular e de hidratação durante a

internação na UTI e associação com desfechos clínicos: um estudo de coorte prospectivo”, que tem como objetivo principal verificar a presença de perda de massa muscular e hiper-hidratação em pacientes que estão internados em UTIs e realizar contato telefônico com esses pacientes após 3 meses da alta hospitalar para verificar se essas condições podem trazer problemas de saúde e afetar a qualidade de vida após a alta hospitalar. Essa pesquisa está sendo coordenada pela professora do curso de Nutrição da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Flávia Moraes Silva e será desenvolvida em parceria com o Serviço de Nutrição do Complexo Hospitalar Santa Casa, com auxílio de uma nutricionista aluna de mestrado e um fisioterapeuta da instituição.

Para alcançar os objetivos do estudo, o ultrassom e a bioimpedância serão realizados durante a internação do paciente na UTI, com duração aproximada de 20 minutos. Serão coletadas também a partir do prontuário eletrônico do paciente informações clínicas, valores de exames de sangue e dados sobre a dieta que o paciente está recebendo. Faremos a estimativa do peso e da altura a partir da medida da circunferência do braço e da medida da altura do joelho, o que já faz parte da rotina de atendimento do nutricionista na UTI. Com uma fita métrica mediremos a circunferência do braço e da panturrilha. Com um plicômetro (um aparelho portátil que “pinça” o músculo) avaliaremos o músculo adutor do polegar (músculo que fica na mão, entre o polegar e o dedo indicador). Essas avaliações da massa muscular e da hidratação do paciente serão feitas no primeiro dia de internação do paciente na UTI, após três, sete, 10 e 14 dias, caso ele permaneça internado na UTI por esse período.

No dia da alta do paciente da UTI, avaliaremos a força do aperto da mão, pedindo para que o paciente aperte um aparelho chamado dinamômetro. Também vamos avaliar a função muscular no dia da alta do paciente da UTI, utilizando um teste com duração aproximada de 20 minutos, em que será avaliada a capacidade de sentar-se e levantar da cama, de caminhar, e a força no ombro e joelho, caso o paciente tenha condições e concorde em realizar o teste. Todos os testes serão realizados apenas se o paciente não tiver nenhum risco definido pela equipe médica e com supervisão profissional. Se o paciente não desejar realizar os testes não há problema. Nós telefonaremos para o paciente ou sua família três meses depois que ele sair do hospital para saber como está a sua saúde e sua qualidade

de vida.

Há riscos mínimos associados à participação dos pacientes nessa pesquisa: o paciente pode sentir um leve desconforto com a colocação dos eletrodos da bioimpedância, com a aplicação do gel e equipamento do ultrassom e com a medida do músculo da mão feitas com o plicômetro. Mas, como o paciente provavelmente estará sedado ele não sentirá esse desconforto nas primeiras avaliações. Quando ligarmos para o paciente ele pode também se sentir desconfortável respondendo perguntas sobre sua qualidade de vida. As pesquisadoras terão todo o cuidado para que esse desconforto seja mínimo e a entrevista será interrompida caso o paciente não queira responder as perguntas. Além disso, o teste para avaliar a função muscular poderá deixar o paciente cansado, mas o avaliador poderá interromper o teste em qualquer momento que o paciente solicitar ou não realizar esse teste caso o paciente não esteja disposto.

O paciente não terá nenhum benefício direto em participar da pesquisa, mas contribuirá para que possamos avaliar se o uso do ultrassom e da bioimpedância devem fazer parte da avaliação dos pacientes internados em UTIs. Não há nenhum custo com a participação nesse estudo e lembramos que a participação de todos os pacientes é voluntária, ou seja, eles só participarão se tiverem interesse. Não participar dessa pesquisa não altera em nada o atendimento do paciente no hospital. Da mesma forma, se você ou o paciente quiserem retirar a participação da pesquisa após ter concordado com a mesma, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Os dados de identificação serão confidenciais e o nome do paciente será preservado. Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pela pesquisadora principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 466/12). Todos os documentos relacionados ao estudo e o processamento computadorizado dos dados (informações e resultados) serão tratados de forma confidencial e somente números e iniciais identificarão os pacientes, garantindo o sigilo dos dados.

EU _____,
recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo com a participação do meu familiar,

_____, no estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.
- De que a participação é voluntária e tanto eu como meu familiar teremos a liberdade de retirar o consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a sua vida pessoal e nem para o atendimento prestado.
- Da garantia que o paciente não será identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora responsável pela pesquisa: Flávia Moraes Silva, pelo telefone 995752778 ou na Universidade - Rua Sarmento Leite, 245, prédio I, sala 401-b.
- Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – telefone 3214.8571, Endereço: Av. Independência, 155 – 6º andar- Hospital Dom Vicente Scherer - POA/RS

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações fornecidas e que decidiu voluntariamente pela participação do seu familiar neste estudo. Uma via será entregue a você e outra será arquivada pelo investigador principal

Nome participante: _____

Assinatura participante _____

Data: __/__/__

Nome pesquisador: _____

Assinatura pesquisador _____

Data: __/__/__

APÊNDICE II

Ficha de coleta de dados

PROJETO DE PESQUISA: Massa muscular e hidratação em pacientes críticos

Questionário no: _____

Data: ____/____/____

Contato 1: _____ Contato 2: _____

Contato 3: _____

Prontuário: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Sexo: M () F ()

Etnia: Branco () Preta () Parda () Amarela () Indígena ()

Data da Internação hospitalar: ____/____/____

Unidade de internação prévia a UTI: Emergência () Enfermaria () Não se aplica () Tempo de internação prévio à UTI: _____

Data da Internação UTI: ____/____/____ Horário: _____

UTI: Santa Clara () Santa Rita () Dom Vicente () Pereira ()

VM: N () S () / MODO: Controlada () Assistida () CA ()

Data início VM: ____/____/____ Data término VM: ____/____/____ HD: N () S () / MODO: Contínua () Intermitente ()

Data início HD: ____/____/____ Data término HD: ____/____/____

Motivo internação prévia à UTI:

Motivo internação na UTI:

História médica pregressa:

Número de comorbidades: _____

Sepse: N () S ()

Medicamentos, sinais vitais, fluidoterapia e PCR:

Dia 1 Dia 3 Dia 5 Dia 7 Dia 14

Sedativo	FR
Analgésico	HGT
Droga vasoativa	Solução NaCl 0,9%
Antibiótico	Ringer de lactato
Diurético	Ringer simples
Temperatura	Solução glicosada 5%
PAM	Plasma
PVC	Dextran
FC	PCR
41	

Balanço hídrico:

EXAMES (Primeiras 24-48h da admissão na UTI – primeira dosagem):

Ureia: _____ Creatinina: _____ Glicemia: _____
Potássio: _____ Albumina: _____ Cálcio: _____ Fósforo: _____
Magnésio: _____ Lactato: _____ pH: _____
Sódio: _____ PO2: _____ PCO2: _____
HCO3: _____ BE: _____ SpO2: _____

ESCORE DE GRAVIDADE

APACHE II	
T (°C): _____ PAM (mmHg): _____ FC (bpm): _____ FR (rpm): _____ FiO2: _____ PCO2: _____ PaO2 (FiO2<50%): _____ A-aPO2 (FiO2>50%): _____ pH arterial ou HCO3: _____ Sódio (meq/l): _____ Potássio (meq/l): _____ Creatinina: _____ IRA: N () S () Hematócrito: _____ Leucócitos: _____ Glasgow (valor aproximado): _____ Idade (anos): _____ Problemas Crônicos de Saúde Se Presentes: 1) Cirrose-Biópsia 2) New York Heart Association Class IV 3) DPOC Severa: Hipercapnia, O2 Dependente, Hipertensão Pulmonar 4) Diálise Crônica 5) Imunocomprometido () Nenhuma (0 pontos) () Não-Cirúrgico (5 pontos) () Cirurgia de Emergência (5 pontos) () Cirurgia Eletiva (2 pontos) TOTAL:	
SOFA	
PaO2: FiO2: Relação PaO2/FiO2 Nº plaquetas - 10³/mm³: PAM (mmHg) Dopamina N () S () Dose (mcg/kg/min): Adrenalina N () S () Dose (mcg/kg/min): Noradrenalina N () S () Dose (mcg/kg/min):	

Glasgow Bilirrubina(mg/dL): Creatinina(m/dL): Diurese(ml/dia): TOTAL:
<i>SAPS III</i>
Idade: < 40 () 40 – 59 () 60 – 69 () 70 – 74 () 75 – 79 () ≥ 80 () Comorbidades: () outras () quimioterapia () ICC NYHA IV () Neoplasia hematológica () Cirrose () aids () metástase Pré-hospitalização: < 14 dias () 14 – 27 dias () ≥ 28 dias () Procedência: () centro cirúrgico () Emergência () Outra UTI () outros Drogas vasoativas: () sim () não Admissão na UTI: programado () urgente (), se urgente: () não cirúrgico () eletivo () emergência Cirurgia: () programada () urgente () não cirúrgico Tipo de cirurgia: () transplante () trauma () RM sem valva () cirurgia no AVC () outras Admissão na UTI: () sim () não, se sim acrescentar 16 pts Motivo de internação: • Neurológicas: () coma/confusão/agitação () convulsões () déficit focal () massa intracraniana • Cardiológicas: () arritmias () choque hemorrágico () choque hipovolêmico não hemorrágico () choque séptico () choque anafilático • Abdômen: () abdômen agudo () pancreatite grave () falência hepática () outras • Infecção: () nosocomial () respiratória () outras Glasgow: ≥ 13 () 12 – 7 () 6 () 5 () 3 – 4 () Frequência cardíaca: () <120 () ≥ 120 - < 160 () ≥ 160 PA sistólica: < 40 () ≥ 40 - 69 () 70 – 119 () ≥ 120 () Oxigenação: () VM relação PaO₂/FiO₂ < 100 () VM relação ≥ 100 () Sem VM PaO₂ < 60 () S VM PaO₂ ≥ 60 Temperatura: ≥ 35 () < 35 () Bilirrubina: icterícia () < 2mg/dL () 2 – 5.9mg/dL () ≥ 6mg/dL Creatinina: <1.2 () 1.2 – 2 () 2 – 2.3 () ≥ 3.5 Leucócitos: < 15000mm³ () ≥ 15000mm³ () pH: >7.25 () ≤ 7.25

Plaquetas: < 20000 () 20000 – 50000 () 50000 – 100000 () > 100000

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA:

Dia 1 Dia 7 Dia 14

AJ

CP

AU

CB

Peso estimado

IMC estimado

EMAP

Estatutura estimada:

EXAME FÍSICO:

Perda de massa muscular () normal () leve () moderado () grave – Local: _____

Perda de gordura subcutânea () normal () leve () moderado () grave - Local: _____

Edema () normal () leve () moderado () grave - Local: _____

Ascite () normal () leve () moderado () grave

BIOIMPEDÂNCIA:

Resistência

Reactância

BIVA

ULTRASSOM:

Espessura RF 1/2 Espessura VI 2/3 Area RF 1/2

Area RF 1/3

Ecogenicidade:

ANAMNESE COM FAMILIAR

Peso usual: _____ Peso atual: _____ Estatura: _____ IMC informado:

_____ Perda ponderal: N () S () / () Intencional () Não intencional

PP (kg): _____ %PP: _____ Período da perda de peso: _____

Consumo em relação ao habitual:

() 0 -25% () 25-50% () 50 – 75% ()

75 – 100%

Há quantos dias: _____

Etilismo: N () S () Insulina: N () S () Quimioterápicos: N () S () Antiácidos:

N () S () Diuréticos: N () S ()

DIETA PRESCRITA:

Enteral () Parenteral ()

Via de acesso: _____

Fórmula: _____

Módulo Proteico: N () S () Quantidade: _____

Data início da TN: ____/____/____ Hora: _____

Volume ALVO: _____ VET (prescrito): _____ PTN

(prescrito): _____

46

Volume infundido MP volume

MP concentração

DIAGNÓSTICO DESNUTRIÇÃO GLIM:

Critérios Fenotípicos - Número de critérios _____

() PP não intencional () Baixo IMC () MM reduzida

() CP () EMAP () Exame Físico **Critérios Etiológicos** - Número de critérios

() Consumo alimentar reduzido () Inflamação/PCR () Assimilação comprometida

Diagnóstico GLIM:

() Sem desnutrição () Desnutrição – 1 critério fenotípico e 1 etiológico () Impossibilidade

() Estágio 1 – Desnutrição moderada / () Estágio 2 – Desnutrição grave

ALTA DA UTI: __/__/__

FAM: ____/____/____ () Direita () Esquerda / () Normal () Reduzida PFIT-S: _____

Tempo (segundos): _____ Número de passos: _____ Cadência (passos/min): _____

Assistência	Cadência	Força no ombro	Força no joelho
0 = incapaz	0 = incapaz	0 = Grau 0, 1, 2	0 = Grau 0, 1, 2
1 =	1 = > 0 – 49	1 = Grau 3	1 = Grau 3

assistência x2			
2 = assistência x1	2 = 50 - <80	2 = Grau 4	2 = Grau 4
3 = nenhuma assistência	3 = 80+	3 = Grau 5	3 = Grau 5

DESFECHOS

Data da Alta UTI: ____/____/____

48

Reinternação em UTI: ____/____/____

Data da Alta Hospitalar: ____/____/____

Óbito: N () S () Local: UTI () Unidade de Internação () Data do Óbito:
____/____/____

Tempo de VM: _____

Tempo de HD: _____

CONTATO TELEFÔNICO

3 MESES: ____/____/____

Reinternação: () N () S Nº de reinternações: _____ Óbito: () N ()
S

Escore qualidade de vida: _____

APÊNDICE III

Teste De Função Física Em Unidades De Terapia Intensiva (PFIT-S): PFIT-S
Brasil

Tempo (segundos): _____ Número de passos: _____

Assistência	Cadência	Força no ombro	Força no joelho
0 = incapaz	0 = incapaz	0 = Grau 0, 1, 2	0 = Grau 0, 1, 2
1 = assistência x2	1 = > 0 – 49	1 = Grau 3	1 = Grau 3
2 = assistência x1	2 = 50 - <80	2 = Grau 4	2 = Grau 4
3 = nenhuma assistência	3 = 80+	3 = Grau 5	3 = Grau 5

Pontuação total: / 12

Valor Ordinal /12	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Valor Intervalo PFIT /10	0	2.0	3.2	3.9	4.4	4.9	5.4	5.9	6.4	7.1	7.9	8.8	10.0

APÊNDICE IV

Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida SF-36

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quanto?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados,	1	2	3

participar em esportes áduos.			
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3

i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2

d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2

b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6

b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranqüilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita	1	2	3	4	5	6

energia?						
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer	1	2	3	4	5

um pouco mais facilmen te que as outras pessoas					
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelent e	1	2	3	4	5

CÁLCULO DOS ESCORES DO QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA

Fase 1: Ponderação dos dados

Questão	Pontuação	
01	Se a resposta for	Pontuação
	1	5,0
	2	4,4
	3	3,4
	4	2,0
	5	1,0
02	Manter o mesmo valor	
03	Soma de todos os valores	
04	Soma de todos os valores	
05	Soma de todos os valores	
06	Se a resposta for	Pontuação
	1	5
	2	4
	3	3
	4	2
	5	1
07	Se a resposta for	Pontuação
	1	6,0
	2	5,4
	3	4,2
	4	3,1
	5	2,0
	6	1,0

08	A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7 Se 7 = 1 e s alor da questão é (6) Se 7 = 2 à 6 valor da questão é (5) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 2, o valor da questão é (4) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (3) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 4, o valor da questão é (2) Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (1) Se a questão 7 não for respondida, o escore da questão 8 passa a ser o seguinte: Se a resposta for (1), a pontuação será (6) Se a resposta for (2), a pontuação será (4,75) Se a resposta for (3), a pontuação será (3,5) Se a resposta for (4), a pontuação será (2,25) Se a resposta for (5), a pontuação será (1,0)

09	Nesta questão, a pontuação para os itens a, d, e ,h, deverá seguir a seguinte orientação: Se a resposta for 1, o valor será (6) Se a resposta for 2, o valor será (5) Se a resposta for 3, o valor será (4) Se a resposta for 4, o valor será (3) Se a resposta for 5, o valor será (2) Se a resposta for 6, o valor será (1) Para os demais itens (b, c,f,g, i), o valor será mantido o mesmo

10	Considerar o mesmo valor.

11	Nesta questão os itens deverão ser somados, porém os itens b e d deverão seguir a seguinte pontuação: Se a resposta for 1, o valor será (5) Se a resposta for 2, o valor será (4) Se a resposta for 3, o valor será (3) Se a resposta for 4, o valor será (2) Se a resposta for 5, o valor será (1)

Fase 2: Cálculo do Raw Scale

Nesta fase será transformado o valor das questões anteriores em notas de 8 domínios que variam de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio. É chamado de raw scale porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

Domínio:

- Capacidade funcional
- Limitação por aspectos físicos
- Dor
- Estado geral de saúde
- Vitalidade
- Aspectos sociais
- Aspectos emocionais
- Saúde mental

Para isso será aplicada a seguinte fórmula para o cálculo de cada domínio:

*Valor obtido nas questões correspondentes – Limite inferior*100 / Variação (Score Range)*

Na fórmula, os valores de limite inferior e variação (Score Range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo.

Domínio	Pontuação das questões correspondidas	Limite inferior	Variação
Capacidade funcional	03	10	20
Limitação por aspectos físicos	04	4	4
Dor	07 + 08	2	10
Estado geral de saúde	01 + 11	5	20
Vitalidade	09 (somente os itens a + e + g + i)	4	20
Aspectos sociais	06 + 10	2	8
Limitação por aspectos emocionais	05	3	3
Saúde mental	09 (somente os itens b + c + d + f + h)	5	25



Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFCSPA

**Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na
fisiopatologia da pré-eclâmpsia**

Proponente: Prof^a. Dra. Gisele Branchini

Equipe: Prof^a. Dra. Fernanda Bordignon Nunes
Prof^a Dra. Helena von Eye Corleta
Acadêmica Thaís Duarte Borges de Moura
Biomédica Érika Santana Leotério

Porto Alegre, julho de 2021

Equipe de pesquisa

<i>Nome</i>	<i>Formação</i>	<i>Vinculação</i>	<i>Função</i>
<i>HELENA VON EYE CORLETA</i>	<i>Graduada em Medicina, especialista em Cirurgia Geral e em Ginecologia e Obstetrícia, mestre em Tocoginecologia e doutora em Medicina</i>	<i>Pesquisadora responsável</i>	<i>Pesquisador responsável Principal responsável pelas biópsias uterinas.</i>
<i>GISELE BRANCHINI</i>	<i>Graduada em Ciências Biológicas, mestre e doutora em Ciências Biológicas: Fisiologia</i>	<i>Pesquisadora</i>	<i>Responsável por gerenciar o projeto e gerenciar os recursos financeiros do estudo.</i>
<i>FERNANDA BORDIGNON NUNES</i>	<i>Graduada em Ciências Biológicas, especialista em toxicologia animal, mestre em Biociências e doutora em Medicina: Ciências Médicas</i>	<i>Pesquisadora</i>	<i>Responsável por gerenciar o estudo.</i>
<i>ALINE ROLIM DA FROTA</i>	<i>Graduada em Medicina e especialista em Ginecologia e Obstetrícia.</i>	<i>Colaboradora</i>	<i>Obstetra responsável pelas coletas das biópsias uterinas.</i>
<i>SABRINA SORAIA SCHROEDER</i>	<i>Graduada em Medicina, especialista em Ecografia em Ginecologia e Obstetrícia, Ultrassonografia e Ginecologia e Obstetrícia</i>	<i>Colaboradora</i>	<i>Obstetra responsável pelas coletas das biópsias uterinas.</i>

THAÍS DUARTE BORGES DE MOURA	Graduada em Ciências Contábeis e acadêmica do curso de medicina da UFCSPA	Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA	Responsável pela coleta de dados, análise e organização do material. Além disso, é responsável por conduzir o processo de consentimento e realizar entrevistas de pesquisa.
ANA PAULA DE BORTOLI SILVEIRA	Graduada em biomedicina pela UFRGS	Colaboradora	Colaboradora na coleta de dados e organização do material. Além disso, auxilia na condução do processo de consentimento e entrevistas de pesquisa.
ÉRIKA SANTANA LEOTÉRIO	Graduada em biomedicina pela UFCSPA	Colaboradora	Colaboradora na coleta de dados e organização do material. Além disso, auxilia na condução do processo de consentimento e entrevistas de pesquisa.

Resumo

As síndromes hipertensivas são as complicações mais frequentes na gestação e constituem, no Brasil, a primeira causa de morte materna, principalmente quando se instalam nas suas formas graves, como a eclâmpsia e a síndrome HELLP. São ainda responsáveis por altas taxas de mortalidade perinatal, prematuridade e restrição de crescimento fetal. A pré-eclâmpsia caracteriza-se pelo aparecimento de hipertensão, com proteinúria e/ou edema; ocorre após a 20ª semana de gestação e é predominantemente patológica. Não é possível a prevenção da pré-eclâmpsia pelo desconhecimento de sua etiologia. Mas, na prática clínica, são utilizados a aspirina e o cálcio em dose baixa nos casos de alto risco para amenizar os sintomas. Sua fisiopatologia relaciona-se com diferenciação trofoblástica, invasão decidual e remodelação das artérias espiraladas de forma defeituosa. Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico. O projeto tem como objetivo avaliar o papel dos canais de cálcio operados por estoque (SOCE) na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e da pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez normotensa. As placentas serão oriundas de mulheres com idade superior a 18 anos, em atendimento obstétrico para parto no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que concordarem em assinar o TCLE. Serão realizadas análises da expressão gênica dos canais de cálcio operados por estoque de amostras da placenta e do leito placentário de mulheres portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas. Será avaliada expressão e localização proteica pela técnica de imuno-histoquímica. O cálcio sérico será dosado do soro e mensurado a partir da técnica de eletrodo íon-seletivo. Serão isoladas e cultivadas células endoteliais placentárias e células musculares lisas arteriais. As células em cultivo serão submetidas à extração de RNA e proteínas para verificar a expressão gênica e proteica dos canais de cálcio operados por estoque nos diferentes tipos celulares. Além disso, as células receberão tratamento com cálcio, sulfato de magnésio e nifedipina, em doses e tempos a serem padronizados, e terão seu potencial elétrico mensurado, de modo a comparar a resposta das células de cada grupo experimental. Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico, incluindo o papel dos componentes moleculares da entrada de cálcio operada por estoque (SOCE).

1. Introdução

Na gravidez, os distúrbios hipertensivos associam-se a um risco maior de complicações para a mãe e o para o recém nascido. As variadas formas de hipertensão arterial na gravidez causam cerca de 14% das mortes maternas, além de se associarem a problemas pós-natais^{1,2}. Os distúrbios hipertensivos da gestação englobam condições distintas, como pré-eclâmpsia, eclâmpsia, hipertensão crônica de qualquer etiologia, hipertensão crônica com pré-eclâmpsia sobreposta e hipertensão gestacional ou transitória³. Dessa forma, observa-se que a gravidez pode induzir hipertensão arterial em uma mulher previamente normotensa ou agravar uma hipertensão preexistente.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou recomendações sobre a suplementação de cálcio durante a gravidez para prevenir a pré-eclâmpsia⁴. Outras organizações de saúde também emitiram declarações sobre a eficácia da suplementação de cálcio na prevenção da pré-eclâmpsia em populações com baixa ingestão alimentar e alto risco de pré-eclâmpsia^{5,6}. No mundo todo, problemas hipertensivos na gravidez constituem uma das causas principais de mortalidade materna⁷. Assim, observa-se que a suplementação de cálcio é uma intervenção preventiva de baixo risco e custo, que tem potencial para efeitos na saúde materna e neonatal⁸.

A diretriz da OMS afirma que: “Em populações onde a ingestão de cálcio é baixa, a suplementação de cálcio como parte do cuidado pré-natal é recomendada para a prevenção da pré-eclâmpsia entre mulheres grávidas, particularmente entre aquelas com maior risco de hipertensão”⁴. Essa recomendação é baseada em evidências de qualidade moderada, metanálises de ensaios clínicos randomizados, em que a suplementação de cálcio preveniu aproximadamente metade dos casos de pré-eclâmpsia⁴.

A pré-eclâmpsia continua sendo uma síndrome que leva a graves repercussões maternas e fetais, conhecendo-se muito pouco a respeito de sua etiologia. Ela é caracterizada pela hipertensão (Pressão Arterial Sistólica ≥ 140 mmHg e Pressão Arterial Diastólica ≥ 90 mmHg) induzida após a 20ª semana de gravidez, acompanhada de sinal clínico, laboratorial ou hemodinâmica de hiperatividade vascular como: proteinúria significativa, disfunções orgânicas maternas (perda de função renal, disfunção hepática, complicações neurológicas, hematológicas – plaquetopenia, hemólise, estado de antiangiogênese ou disfunção uteroplacentária, como crescimento fetal restrito, alterações no doppler, artéria umbilical alterada).

Muitas teorias foram propostas para compreender melhor o quadro clínico. Algumas sugeriram a existência de fatores imunogenéticos com implicação do gene da síntese do óxido nítrico e do sistema Human Leucocyte Antigens (HLA), considerados importantes no início do processo fisiopatológico. Além disso, esses fatores acrescidos do endotélio poderiam ser influenciados pelas grandes modificações gestacionais⁹⁻¹². Essas modificações provocam a má adaptação placentária, com falha da remodelação e na infiltração de células trofoblásticas nas

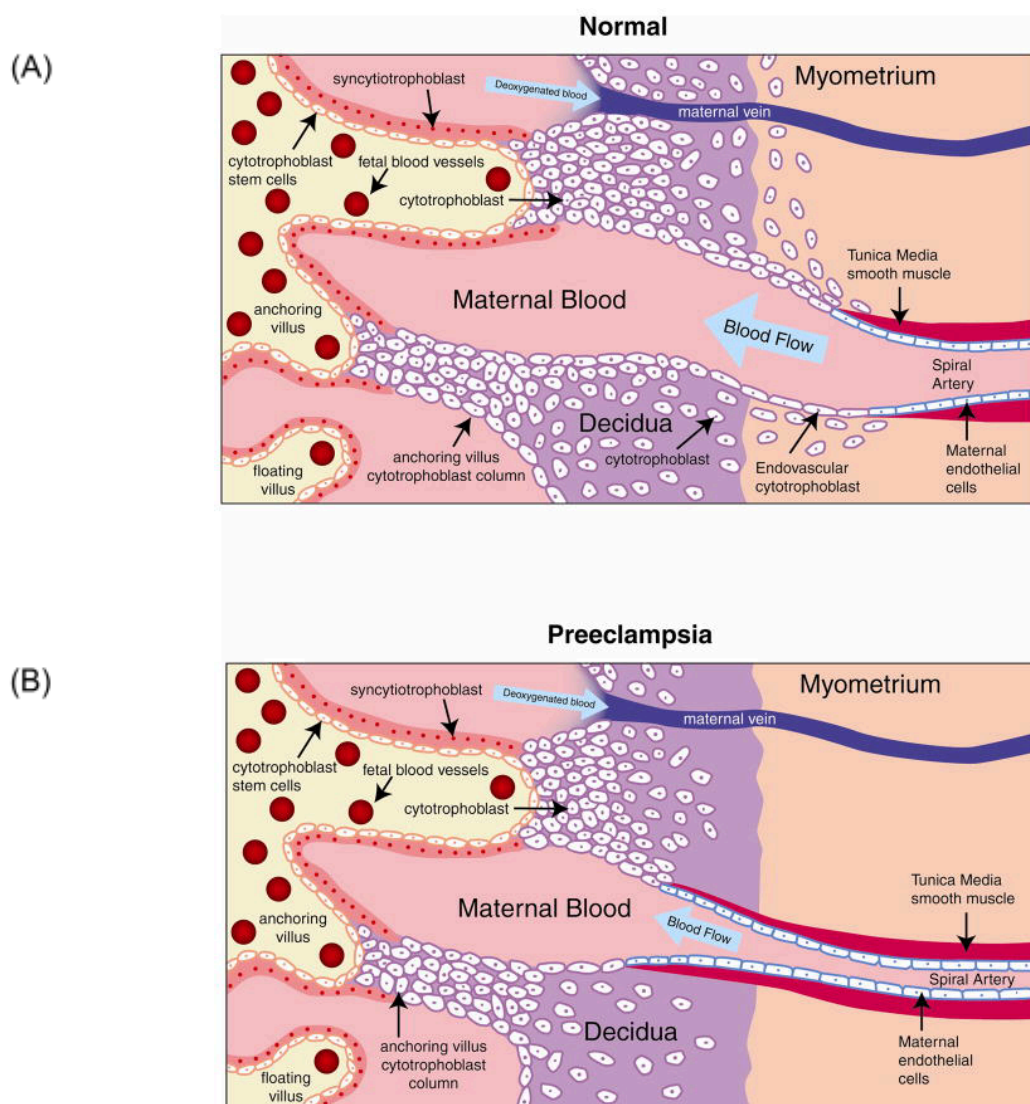
arteríolas espiraladas e subsequente hipoperfusão placentar¹¹.

A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbimortalidade materna e perinatal, do parto prematuro e da restrição do crescimento intrauterino¹³. Esta síndrome ocorre em cerca de 2% a 8% das gestações, porém este índice pode aumentar para 15 a 20% quando as gestantes apresentam hipertensão crônica, diabetes pré-gestacional, gravidez múltipla ou se tiveram pré-eclâmpsia em gestação prévia^{14,15,16}. Além disso, possui como fatores de riscos a primiparidade, histórico familiar, doença renal crônica, doença do colágeno, trombofilias, obesidade, gestação molar, hidropsia fetal, extremos da vida reprodutiva (> 35 anos ou adolescente), raça negra, longo intervalo interpartal e síndrome antifosfolípideo. Em mulheres normotensas e hipertensas, o aumento da rigidez arterial é apresentado como um marcador de grande risco para problemas cardiovasculares, de forma até mais significativa que os valores elevados de pressão arterial periférica¹⁷⁻¹⁹.

Apesar da etiologia da pré-eclâmpsia não estar bem definida, ela está primariamente associada à presença da placenta e a diminuição da perfusão desta, principalmente devido a uma má formação das artérias espiraladas maternas e ao aumento da resistência vascular^{20,21}. A melhor terapêutica para esse distúrbio deve observar sempre à redução dos índices de morbimortalidade por prevenção de complicações²². O tratamento definitivo da pré-eclâmpsia é o parto, mais especificamente a retirada da placenta¹⁶. Dependendo de fatores como idade gestacional, gravidade, bem-estar fetal e presença ou não de complicações, a interrupção da gravidez está indicada. No entanto, a apresentação precoce da doença aumenta a chance de prematuridade com subsequente incremento da morbimortalidade perinatal²³. A evolução da pré-eclâmpsia é variável, enquanto algumas não progridem para a forma mais grave da doença, outras apresentam essa evolução em questões de dias ou horas, sendo imprescindível o monitoramento contínuo dessas pacientes²¹.

Assim, na tentativa de analisar a resistência e alteração cardiovascular que caracteriza a pré-eclâmpsia na gestação, deve-se observar mais cuidadosamente os fatores fisiológicos que regulam a pressão arterial, em especial o tônus vascular. Diante disso, para a correta formação estrutural da placenta é necessário que as artérias espiraladas maternas sejam remodeladas²¹. Conforme demonstrado na figura 1, esses vasos sanguíneos são invadidos por células trofoblásticas, resultando na perda das células endoteliais e das células musculares lisas de suas porções distais, restando apenas uma estrutura dilatada que as ligam ao espaço intervilloso²⁴. Uma vez que o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é a retirada da placenta, as terapias atuais visam evitar a morbimortalidade, tratando somente a sintomatologia apresentada, sem a existência de um medicamento de escolha para tratamento das gestantes pré-eclâmpicas³.

Figura 1 – Placentação anormal na pré-eclâmpsia.



(A) No desenvolvimento normal da placenta, os citotrofoblastos de origem fetal invadem as artérias espirais maternas, transformando-as de vasos de resistência de pequeno calibre em vasos de capacitância de alto calibre, capazes de fornecer perfusão placentária adequada para sustentar o feto em crescimento. Durante o processo de invasão vascular, os citotrofoblastos se diferenciam de um fenótipo epitelial para um fenótipo endotelial, um processo denominado "pseudovasculogênese" ou "mimetismo vascular".

(B) Na pré-eclâmpsia, os citotrofoblastos não conseguem adotar um fenótipo endotelial invasivo. Em vez disso, a invasão das artérias espiraladas é rasa e permanecem vasos de pequeno calibre com maior resistência (painel inferior). Fonte: Powe CE.³²

As evidências de estudos randomizados mostram que o uso de cálcio ajuda a prevenir a pré-eclâmpsia, o parto prematuro e a reduzir o risco de uma mulher morrer ou ter problemas sérios relacionados à pressão alta durante a gravidez²⁵. Isso serve especialmente para mulheres em dietas com baixo teor de cálcio.

A baixa ingestão de cálcio pode resultar em uma pressão arterial elevada ao estimular a liberação de paratormônio (PTH) ou a liberação de renina, aumentando assim o cálcio intracelular no músculo liso vascular²⁶ e levando à vasoconstrição. Um possível modo de ação

para a suplementação de cálcio é que ele reduz a liberação de paratormônio e, em consequência, a concentração de cálcio intracelular, reduzindo assim a contratilidade do músculo liso. Por um mecanismo semelhante, a suplementação de cálcio também pode reduzir a contratilidade do músculo liso uterino e prevenir o trabalho de parto prematuro²⁷. Evidências também indicam que a suplementação de cálcio afeta o fluxo sanguíneo útero-placentário, reduzindo o índice de resistência nas artérias uterinas e umbilicais²⁸. Além disso, a suplementação na segunda metade da gravidez parece reduzir a pressão arterial diretamente, em vez de prevenir o dano endotelial associado à pré-eclâmpsia²⁹.

Assim, a suplementação de cálcio é importante para reduzir o risco de uma mulher desenvolver pré-eclâmpsia, sendo o uso seguro para a gestante e o feto. Além disso, existe a possibilidade de que possa haver um efeito preventivo sobre o risco de hipertensão nos descendentes³⁰.

Além do uso preventivo do cálcio, orientado pela OMS⁴, outro fármaco com a mesma função é o sulfato de magnésio, visto que ele apresenta grande eficácia no controle das crises convulsivas e ainda inibe o trabalho de parto prematuro³¹. Biologicamente, o magnésio está inserido em uma variedade de reações fisiológicas. No entanto, por ser um antagonista fisiológico natural do cálcio, ele é capaz de reduzir a resistência vascular periférica³¹. Ademais, a nifedipina utilizada para controle hipertensivo na gestação atua bloqueando canais de cálcio, reduzindo a concentração de cálcio intracelular, resultando no relaxamento da musculatura vascular. É também utilizado como hipotensor, vasodilatador e tocolítico²⁴.

Assim, diante do papel imprescindível do cálcio - tanto na prevenção da pré-eclâmpsia, quanto como agente vasoconstritor. Assim, é de fundamental importância a análise detalhada dos canais de cálcio nas células musculares lisas das células espiraladas materna, para esclarecer a relação do cálcio com esta doença.

Os canais de cálcio podem ser classificados conforme a tabela 1 e 2. No entanto, é importante evidenciar os canais do tipo store-operated channels calcium (SOCC), pois, em células não excitáveis, a ativação de receptores ligados à fosfolipase C acoplada à proteína G (PLC) causa a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, que é seguida pela entrada transmembrana de Ca^{2+} . Esta entrada de cálcio é a base de uma fase pequena e sustentada do aumento na concentração intracelular. Além disso, é importante para várias funções celulares, incluindo expressão gênica, secreção e proliferação celular. Em células excitáveis, como as células musculares lisas das artérias espiraladas, esse mecanismo de entrada de Ca^{2+} é importante para contração muscular³³.

Tabela 1 - Canais de Cálcio Voltagem Dependentes.

Tipo	Voltagem	Subunidade	Local
Canais de Cálcio tipo L	Ativado por alta tensão	$\alpha 2 \delta$, β , γ	Músculo esquelético, Músculo Liso, osteoblasto, neurônios corticais, etc.
Canais de Cálcio tipo P	Ativado por alta tensão	$\alpha 2 \delta$, β	Células de Purkinje e células granulares do cerebelo
Canais de Cálcio tipo N	Ativado por alta tensão	$\alpha 2 \delta$ / $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$	Cérebro e SNP
Canais de Cálcio tipo R	Ativado por tensão intermediária	$\alpha 2 \delta$, β	Células granulares cerebelares
Canais de Cálcio tipo T	Ativado por baixa tensão	-	Neurônios, osteócito

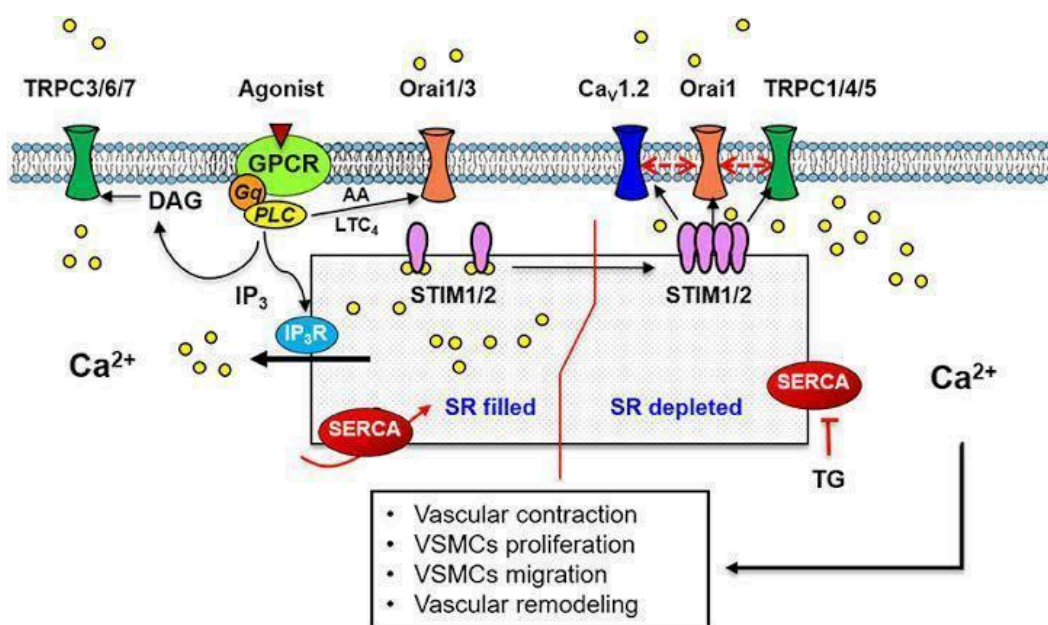
Tabela 2 - Canais de Cálcio operados por receptores.

Tipo	Mecanismo de Fechamento	Gene	Localização	Função
Receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)	IP3	ITPR1, ITPR2, ITPR3	Retículo Endoplasmático	Libera cálcio em resposta ao IP3 do Retículo Endoplasmático
Receptor de Rianodina	Receptores de Diidropiridina	RYR1, RYR2, RYR3	Retículo Endoplasmático	Libera cálcio
Two-pore channel	Ácido nicotínico adenina dinucleotídeo fosfato (NAADP)	TPCN1, TPCN2	Membrana Lisossomo e Endossomo	Transporte de cálcio ativado por NAADP através das membranas endossômicas e lisossomais
Canais de Cátions do esperma	Cálcio	PKD2	Flagelo	Ajuda a direcionar os espermatozóides no trato reprodutivo feminino
Store-operated channels calcium (SOCC)	Diminuição de Cálcio no Retículo Endoplasmático	ORAI1, ORAI2, ORAI3	Membrana Plasmática	Sinalização de cálcio ao citoplasma

Um modelo para o acoplamento de excitação e contração, em uma célula de músculo liso tônico, em que a contração sustentada envolve a entrada de cálcio foi apresentada recentemente, conforme a figura 2. Fisiologicamente, a entrada de cálcio operada por armazenamento (SOCE) é iniciada pela estimulação de receptores que se acoplam por meio da proteína de ligação a GTP (proteínas G) para ativar a fosfolipase- $C\beta$ (PLC β) ou por estimulação de receptores que se acoplam por meio de fosforilação de tirosina para ativar PLC γ . Essa ação resulta na decomposição e produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Este

segundo mensageiro ativa os receptores IP₃, que são canais dependentes de cálcio localizados no retículo endoplasmático, liberando o cálcio armazenado. A liberação resultante de cálcio no citoplasma causa um aumento transitório na concentração de cálcio intracelular, enquanto que o esvaziamento dos estoques de Ca²⁺ gera um sinal retrógrado que ativa SOCCs na membrana plasmática, isso ocorre simultaneamente em um curto espaço de tempo. Como consequência, as reservas de Ca²⁺ esgotadas geram uma molécula mensageira chave chamada Fator de Influxo de Cálcio (CIF), que se difunde para a membrana plasmática. Uma cascata de reações ativam os SOCCs. Nesse aspecto, a liberação de cálcio do retículo endoplasmático faz com que a proteína STIM1 (sensora de Ca²⁺) se agregue em áreas próximas à membrana plasmática e interaja com SOCC (ou seja, Orai1, Ca_v1.2 e TRPC 1/4/5). Acredita-se que seja esse o mecanismo de entrada de cálcio operada por armazenamento³³.

Figura 2 – Esquema que ilustra o mecanismo padrão e os componentes moleculares de SOCE em células de músculo liso vascular.

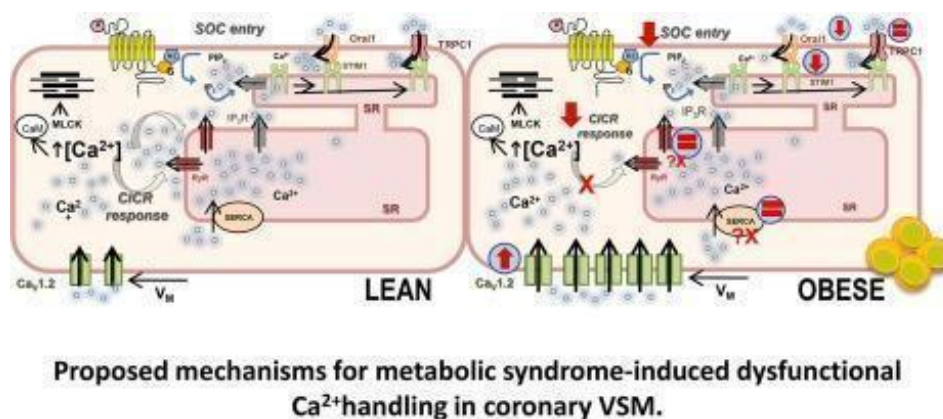


Fonte: Ávila-Medina J³⁴

Um estudo recente relaciona os canais tipo SOCC com a Síndrome Metabólica em vasos coronarianos de ratos obesos. Esse estudo mostrou que, por um lado, a entrada SOCE é prejudicada devido a STIM1 e Orai1 estarem deficientes, mas a expressão da proteína TRPC1 permanece inalterada. Por outro lado, a resposta prejudicada da liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) foi diminuída sem alteração do receptor de Ryanodina (RyR) nem da expressão de proteína total de SERCA. No entanto, a entrada de cálcio através de canais do tipo L dependentes de voltagem, via expressão aumentada do canal Ca_v1.2, conseguiu preservar a vasoconstrição induzida pela despolarização em artérias

coronárias de ratos Zucker obesos³⁵. Talvez o mecanismo do cálcio que esteja alterado nas artérias coronarianas, na Síndrome Metabólica, onde há uma diminuição no mecanismo SOCE e uma vasoconstrição preservada (conforme figura 3), também esteja alterado em artérias espiraladas do miométrio uterino.

Figura 3 – Mecanismo de disfunção de cálcio na Síndrome Metabólica em células do músculo liso coronariano



Fonte: Belém C.³⁵

Diante do exposto, infere-se a importância do estudo dos canais de cálcio operados por armazenamento no estudo da pré-eclâmpsia. Os conhecimentos gerados a partir deste projeto terão potencial para aprimorar o manejo de gestantes com pré-eclâmpsia, uma vez que diferentes alvos terapêuticos poderão ser futuramente explorados para contribuir na redução da morbimortalidade materna e perinatal.

2. Justificativa

Atualmente, não existe prevenção à pré-eclâmpsia pelo desconhecimento de sua etiologia. No entanto, estudos apontam o uso do cálcio em doses baixas nos casos de alto risco. A fisiopatologia dessa doença relaciona-se com diferenciação trofoblástica, invasão decidual e remodelação das artérias espiraladas de forma defeituosa. Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico, incluindo o papel dos componentes moleculares da entrada de cálcio operada por estoque (SOCE).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos componentes da entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e da pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez normotensa.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica e proteica dos componentes moleculares da entrada de cálcio operada por depósito (SOCE), as proteínas Orai1, TRPC1, $Ca_v1.2$ e STIM1, em células de músculo liso vascular da placenta materna e fetal;
- Avaliar a alteração do potencial elétrico das células musculares lisas arteriais e células endoteliais placentárias em cultivo em resposta ao tratamento com cálcio, sulfato de magnésio e nifedipina;
- Avaliar a associação dos dados de expressão dos canais, bem como das alterações de potencial elétrico das células em resposta aos tratamentos acima descritos, com os diferentes graus de pré-eclâmpsia;
- Avaliar a associação dos dados obtidos nas análises das amostras coletadas com desfechos neonatais (peso, comprimento, Apgar).

4. Material e Métodos

4.1 Delineamento da Pesquisa

Estudo transversal comparativo e um estudo experimental *in vitro*.

4.2 Amostra

Serão coletadas três amostras: uma colheita de sangue, uma do útero da participante da pesquisa e uma da placenta. Amostras de placenta fetal e do leito placentário materno coletadas de mulheres com idade superior a 18 anos, sem histórico de hipertensão prévia, que receberam atendimento obstétrico para cesariana no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e que consentiram na sua participação no estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3 Sujeitos de Pesquisa

Para recrutamento da amostra, serão selecionadas 224 participantes, sendo 149 para Grupo controle (sem pré-eclâmpsia) e 45 para Grupo pesquisa (com pré-eclâmpsia). Para esta seleção, será adotada a seguinte estratégia: na sequência da internação de pacientes que apresentarem indicação de cesariana pela equipe assistente, um membro da equipe do projeto as convidará verbalmente para participar do estudo de forma voluntária e explicará os procedimentos metodológicos da pesquisa. As voluntárias serão questionadas nesse momento a respeito das informações referentes aos critérios de inclusão e exclusão, os quais serão preenchidos conforme a primeira parte do Check-list do estudo, apresentado no Apêndice I.

Em relação à via de parto, serão incluídas somente cesáreas. O convite e o processo de consentimento serão adotados no momento anterior ao encaminhamento da paciente à sala do bloco cirúrgico do centro obstétrico, após a recepção pela equipe assistente, onde as pesquisadoras responsáveis pelo processo estarão aguardando. Por este motivo, serão incluídas somente as cesáreas eletivas, nas quais há a possibilidade de obtenção do consentimento de forma tranquila e sem prejuízo ao entendimento sobre a participação no estudo.

As mulheres que se enquadrarem nos critérios de inclusão para cada um dos grupos experimentais (descritos abaixo) deverão ler, assinar e datar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3.1 Critérios de Inclusão para o grupo Pré-Eclâmpsia

- Possuir idade maior ou igual a 18 anos.
- Apresentar diagnóstico de pré-eclâmpsia leve ou grave (Pressão Arterial Sistólica ≥ 140 mmHg e Pressão Arterial Diastólica ≥ 90 mmHg, induzida após a 20ª semana de gravidez, acompanhada de sinal clínico, laboratorial ou hemodinâmica de hiperatividade vascular como: proteinúria significativa, disfunções orgânicas maternas (perda de função renal, disfunção hepática, complicações neurológicas, hematológicas – plaquetopenia, hemólise, estado de antiangiogênese ou disfunção uteroplacentária, como crescimento fetal restrito, alterações no doppler, artéria umbilical alterada), sem história clínica de hipertensão em período anterior a gestação.

4.3.2 Critérios de Inclusão para o grupo Controle

- Possuir idade maior ou igual a 18 anos.
- Apresentar pressão normal antes e durante a gestação.

4.3.3. Critérios de Exclusão

Serão excluídas do estudo gestantes com diagnóstico prévio de nefropatia, hepatopatia, tireoideopatias, infecções ativas (como infecção do trato urinário) ou que apresentem gestações múltiplas. Gestantes normotensas com proteinúria $\geq 1+$ no exame qualitativo de urina também serão excluídas. Não serão excluídas as participantes que fizerem uso de medicamentos para controle da pré-eclâmpsia, mas os seus dados serão avaliados de forma estratificada. Além disso, em virtude da coleta de fragmento de decídua do leito placentário, serão excluídas as pacientes que apresentarem síndrome Hellp ou outro distúrbio da coagulação. Também serão excluídas pacientes com placentação anômala pelo risco de sangramento aumentado no leito uterino.

4.4 Coleta das Amostras

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, as participantes serão submetidas a coleta das três amostras: uma colheita de sangue, uma do útero da participante da pesquisa e uma da placenta. Além disso, será feito o uso de informações retiradas de prontuário tanto da mãe quanto do bebê.

A coleta de volume sanguíneo antes de qualquer infusão sorológica de modo a evitar hemodiluição. A coleta sanguínea será realizada por profissional capacitado e habilitado para os procedimentos, bem como o local será previamente preparado higienizado para a realização do procedimento. As amostras de sangue serão acondicionadas em tubos do tipo *vacutainer* específicos para separação de soro (sem anticoagulante).

Durante a cesariana, após a retirada do concepto e da placenta, o leito placentário será identificado e uma porção de aproximadamente 0,5 cm será pinçada com Allis e um pequeno fragmento será ressecado com tesoura de Matzembbaum. A hemostasia será revisada e o procedimento cirúrgico seguirá o andamento habitual. Esta biópsia do leito placentário (face materna) terá o tamanho de um disco em torno de 1,5 cm de diâmetro da parte central do leito placentário e terá a forma de cunha não mais profunda do que 0,5 cm. Após isso, esta amostra será entregue a membros da pesquisa para processamento. Ela será dividida em três fragmentos para análises distintas: biologia molecular, imuno-histoquímica e cultivo celular. As amostras de tecido destinadas às análises de biologia molecular serão acondicionadas em RNA *later* e posteriormente congeladas a -80 °C. As amostras destinadas à imuno-histoquímica serão acondicionadas em frasco contendo formalina tamponada. As amostras destinadas aos cultivos celulares serão acondicionadas em tubos tipo falcon de 15 mL contendo solução salina de Hank's estéril e refrigerada. Esse procedimento será feito com a maior brevidade possível, de modo a não atrapalhar ou interferir nas etapas subsequentes da cesariana. Caso haja qualquer intercorrência durante a cirurgia, a coleta será imediatamente cancelada.

Além disso, será coletada uma amostra da placenta fetal. Da mesma forma, será dividida em três fragmentos para análises distintas: biologia molecular, imuno-histoquímica e cultivo celular. Todos serão armazenados conforme as biópsias placentárias maternas.

Todos os frascos contendo amostras de sangue ou das placentas estarão identificados por um código numérico, de modo a preservar a identificação da paciente. O transporte até o Laboratório de Fisiologia Translacional da UFCSPA será feito em recipiente térmico adequado, contendo gelo reutilizável para preservação resfriada das amostras. O profissional responsável pelo transporte usará equipamento de proteção individual adequado para transporte e manuseio das amostras.

As amostras fixadas em formalina serão encaminhadas ao Laboratório de Patologia da UFCSPA para realização de imuno-histoquímica. As amostras destinadas às análises de biologia molecular serão armazenadas em freezer -80 °C até o processamento para avaliação da expressão gênica no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. As amostras destinadas aos cultivos celulares serão encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA, onde serão processadas conforme descrição abaixo. As amostras de sangue serão processadas e armazenadas no Laboratório de Fisiologia Translacional, conforme descrito adiante.

Também serão coletadas informações clínicas de prontuário sobre a parturiente e o concepto (peso, comprimento, Apgar), conforme identificado no Chek-list (apêndice I), para posterior avaliação de associação com os dados moleculares avaliados no laboratório, descritos abaixo.

4.5 Avaliação da expressão dos canais de cálcio

4.5.1 Expressão gênica

A expressão gênica será avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (RT-qPCR). O RNA total será extraído das amostras com o uso do reagente Trizol, seguindo-se a síntese do cDNA (DNA complementar) com o uso do Kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). A amplificação do mRNA dos genes de interesse será realizada pela técnica de PCR em tempo real com oligonucleotídeos (primers) específicos no aparelho 7500 Fast (Applied Biosystems), com o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) o qual possui um corante fluorescente exclusivo, semelhante ao SYBR Green I. A reação será normalizada pela expressão dos genes normalizadores (a serem testados nas amostras para escolha – β -actina, beta-2-microglobulin, hypoxanthine phosphoribosyltransferase, succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

As sequências nucleicas dos genes de interesse (canais de SOCC) serão identificadas in silico no genoma humano. As sequências dos genes do genoma humano estão disponíveis na base de dados ENSEMBL.org e GenBank. Após a identificação das sequências proteicas, primers sense e antisense serão desenhados e utilizados nas reações de qPCR para a amplificação de fragmentos dos genes. Todos os primers serão desenhados com o auxílio da ferramenta IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc.) e sintetizados pela IDT.

4.5.2 Avaliação da expressão e localização proteica

Para avaliação da expressão e localização celular dos canais em estudo, será realizada a técnica de imuno-histoquímica. Os tecidos provenientes das amostras serão fixados em formalina e submetidos ao procedimento normal de patologia para inclusão em parafina e subsequente realização da técnica de imuno-histoquímica. Após o procedimento de desparanifização dos cortes, será realizada a recuperação antigênica e o bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, será feito o bloqueio das ligações inespecíficas e incubação com o anticorpo primário. Serão utilizados anticorpos primários tendo como alvo as proteínas dos canais de membrana Orai1, TRPC1, Ca_v1.2 sensível à voltagem e STIM1, bem como anticorpos secundários para realizar o restante dos procedimentos. Esses anticorpos serão selecionados conforme especificidade para realização da técnica de imuno-histoquímica, bem como serão escolhidos conforme análise de melhor custo-benefício dentre as empresas fabricantes. Após incubação com o anticorpo secundário, as lâminas serão incubadas com anticorpo terciário do mesmo kit e em seguida será feita a revelação com substrato cromógeno, a desidratação e a montagem com Entellan. As lâminas serão avaliadas e suas imagens capturadas para posterior análise com auxílio de um software de processamento de imagem. Estas técnicas serão realizadas no Laboratório de Patologia da

UFCSPA.

4.6 Dosagem sérica de cálcio

Após a colheita sanguínea as amostras serão centrifugadas por 10 minutos a 2500 x g para separação do soro, que será armazenado a -20 °C até a análise. A dosagem de cálcio sérico será realizada pela técnica de eletrodo íon seletivo a partir do soro.

4.7 Isolamento e cultivo celular

4.7.1 Isolamento e cultivo de células endoteliais

Para os cultivos de células endoteliais uma parte dos fragmentos coletados que foram acondicionados em solução salina de Hank's estéril e refrigerada serão lavados com uma solução PBS para remover todos os traços sanguíneos. O fragmento será incubado por 20 minutos a temperatura ambiente com solução PBS contendo 0,05% de tripsina e 0,53 mmol/L de EDTA. Após este período será adicionado meio M199 enriquecido com 10% de soro bovino fetal e o fragmento será centrifugado a 2500 x g por 10 minutos. As células serão plaqueadas em placas de Petri contendo meio livre de células endoteliais (EC-SFM; Gibco-brl, Grand Island, New York) e meio M199 na proporção de 1:1, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e penicilina-estreptomicina. As culturas serão mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios serão renovados após as primeiras 24 horas e após a cada 2 ou 3 dias. Quando as células endoteliais atingirem confluência de 80%, serão subcultivadas com 0,05% de tripsina/EDTA. O intervalo entre as subculturas será de 7 dias e apenas células de segunda ou terceira passagem serão utilizadas para estudo devido a melhor manutenção da integridade celular³¹.

4.7.2 Isolamento e cultivo de células arteriais musculares lisas

Fragmento das artérias espiraladas, isoladas das biópsias coletadas, que foram acondicionados em solução salina de Hank's serão lavados três vezes com solução salina de Hank's acrescida de 2% de penicilina-estreptomicina e 50 U/mL de nistatina. Após cortar o tecido longitudinalmente, pedaços de aproximadamente 3 a 5 mm serão dissecados e plaqueados em 5 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enriquecido com 10% de soro fetal bovino e penicilina-streptomicina. As culturas serão mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios serão retirados e trocados duas vezes por semana. Quando as células endoteliais atingirem confluência de 80%, serão cultivadas em meio DMEM sem soro pelo período de 24 horas para eliminar fibroblastos e células endoteliais. Após este período, meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, será acrescentado à cultura celular e as células estarão prontas para o seguimento dos estudos³².

4.8 Análises eletrofisiológicas

As células em cultivo serão submetidas à extração de RNA e proteínas de modo a verificar a expressão gênica e proteica dos canais de cálcio nos diferentes tipos celulares, conforme as técnicas descritas acima. Além disso, as células receberão tratamento com cálcio, sulfato de magnésio ou nifedipina, em doses e tempos a serem padronizados, e terão seu potencial elétrico mensurado, de modo a comparar a resposta das células de cada grupo experimental.

Para o estudo da eletrofisiologia, o potencial de membrana das células íntegras será registrado em temperatura ambiente utilizando pipeta ou solução intracelular contendo 145 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 5 mM de EGTA, 2 mM de adenosina trifosfato de magnésio, 0,1 mM de GT e 10 mM de HEPES, com o pH final ajustado para 7,2 com hidróxido de potássio. A solução do banho externo das células será composta por 140 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 5 mM de HEPES e 10 mM de glicose, com pH final ajustado para 7,4 com NaOH. O potencial será obtido a cada segundo, estimulado por pulsos despolarizantes de 300 ms a partir de um potencial de -70 mV até 80 mV, seguindo acréscimos de 10mV³³.

4.9 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo amostral foi feito a partir de dados de um estudo prévio do grupo de pesquisa, que avaliou a expressão gênica de canais de cálcio em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia e normotensas. Este estudo encontra-se em fase de finalização, de modo que os dados ainda não estão publicados. Para fins do cálculo amostral, foram usados os dados de expressão do canal de cálcio dependente de cálcio (K_{Ca} 3.1), com expressão de 4,17 unidades arbitrárias $\pm$ 6,77 UA de expressão gênica, com N = 41 para o grupo controle, e 6,87 $\pm$ 6,74 UA de expressão gênica, com N = 25 para o grupo pré-eclâmpsia, com $p = 0,010$ pelo teste U de Mann-Whitney. O tamanho amostral, considerando um poder de 90% e nível de significância de 0,05, foi de 224 pacientes (75 grupo pré-eclâmpsia e 149 grupo controle). O cálculo do tamanho amostral foi realizado com o programa WinPepi.

4.10 Análises estatísticas

A descrição da amostra será realizada através da estatística descritiva. A normalidade das variáveis será avaliada através do teste Shapiro-Wilk. A comparação das variáveis quantitativas será pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Bonferroni para comparação intragrupos. E na comparação intergrupos através do teste t

de Student para amostras pareadas. Caso as variáveis em estudo não apresentem distribuição normal, serão utilizados os testes estatísticos não paramétricos correspondentes.

O índice de significância adotado será de $p < 0,05$ em todas as comparações. Os dados serão analisados pelo pacote estatístico computacional SPSS para Windows, versão 22.0.

4.11 Dados da amostra

Os dados coletados serão armazenados em planilha do Google Drive com compartilhamento exclusivo da equipe participante do estudo. Além disso, a cada atualização dos dados uma nova planilha será gerada, como backup, em formato Excel versão 2019 (16.0) e será armazenada no computador pessoal da mestranda que coletará os dados.

5. Locais de realização do estudo e dados da amostra

As amostras de placenta e soro serão obtidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após o entendimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) do HCPA e da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

As análises de biologia molecular, imuno-histoquímica e as dosagens séricas previstas neste estudo serão realizadas nas dependências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, nos Laboratórios de Fisiologia Translacional, de Biologia Molecular e de Patologia. Os cultivos celulares serão feitos no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA.

Cabe salientar que este projeto não prevê nenhuma intervenção que possa interferir nos desfechos clínicos das pacientes.

6. Cronograma do Projeto

	2021		2022				2023				2024				2025			
	A G O - S E T	O U T - D E Z	J A N - M A R	A B R - J U N	J U L - S E T	O U T - D E Z	J A N - M A R	A B R - J U N	J U L - S E T	O U T - D E Z	J A N - M A R	A B R - J U N	J U L - S E T	O U T - D E Z	J A N - M A R	A B R - J U N	J U L - S E T	O U T - D E Z
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Compra de materiais	X	X	X	X														
Coleta das amostras		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Dosagem sérica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Isolamento e cultivo celular					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análises eletrofisiológicas						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Avaliação da expressão gênica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Avaliação da expressão proteica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise dos dados			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Submissão de artigo científico									X	X								X

As coletas das amostras só poderão ser iniciadas após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

7. Orçamento

Este projeto será custeado pelos pesquisadores envolvidos. Parte do material das análises encontra-se disponível nos locais de realização do estudo na UFCSPA. Materiais de escritório e expediente da equipe executora também terão custeios próprios.

Item	Quantidade	Valor unitário	Valor Total
Material para coleta de sangue	100	R\$ 0,45	R\$ 45,00
Criotubos (pct com 100)	01	R\$ 133,65	R\$ 133,65
Luvas de Procedimento cx 50 pares sem talco	10	R\$ 20,00	R\$ 200,00
Trizol (Invitrogen) 100 MI	01	R\$ 650,00	R\$ 650,00
Qubit RNA HS Assay kit (Invitrogen) (100 ensaios)	01	R\$ 403,75	R\$ 403,75
Kit para síntese de cDNA (GoScript) (Promega)	01	R\$ 1.009,50	R\$ 1009,50
Kit para qPCR (GoTaq) (Promega)	02	R\$ 1.050,00	R\$ 2.100,00
Primers (IDT)	02	R\$ 120,00	R\$ 240,00
Placas para qPCR (Life Technologies) (com 10 unid)	03	R\$ 162,13	R\$ 486,39
Adesivo óptico para placas de PCR (Life Technologies)	01	R\$ 403,00	R\$ 403,00
Anticorpos primários	03	R\$ 3.000,00	R\$ 9.000,00
Anticorpos secundários	02	R\$ 1.100,00	R\$ 2.200,00
Formalina (4L)	01	R\$ 338,00	R\$ 338,00
Parafina (1kg)	01	R\$ 250,00	R\$ 250,00
Substrato cromógeno (1g)	01	R\$ 207,00	R\$ 207,00
Dosagem de Ca ⁺ sérico	80	R\$ 20,00	R\$ 1.600,00
Meio de cultivo M199 (pó para 10L)	01	R\$ 223,47	R\$ 223,47
Meio de cultivo DMEM (pó para 10L)	01	R\$ 172,44	R\$ 172,44
Meio EC-SFM (500 mL)	02	R\$ 402,75	R\$ 805,50
Solução de Hank's	01	R\$ 102,00	R\$ 102,00
Soro fetal bovino (500 mL)	01	R\$ 285,00	R\$ 285,00
Placas de cultura 6 poços	20	R\$ 5,85	R\$ 117,00
Garrafas para cultivo celular 25cm ² (pct com 10)	10	R\$ 7,00	R\$ 70,00
Nistatina (100 mL)	01	R\$ 186,00	R\$ 186,00
Penicilina-Estreptomicina (100 mL)	02	R\$ 106,00	R\$ 212,00
Sulfato de magnésio (250g)	01	R\$ 326,00	R\$ 326,00
Nifedipina (1g)	01	R\$ 426,00	R\$ 426,00
VALOR TOTAL			R\$ 22.191,70

Na tabela acima estão listados os materiais necessários para o desenvolvimento do projeto e a verba direcionada a cada item. Materiais como ponteiras, microtubos, tubos tipo Falcon, lâminas e lamínulas, bem como alguns reagentes, como álcool etílico e isopropílico, já foram adquiridos e encontram-se à disposição nos laboratórios em que as técnicas serão executadas. Os primers para os genes normalizadores também já estão disponíveis para uso.

8. Aspectos Éticos

A presente proposta está de acordo com a Resolução 466/2012 no que diz respeito à realização de pesquisa com seres humanos. O projeto será encaminhado para os Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFCSPA e do HCPA para análise e aprovação.

8.1. Riscos e Benefícios

Os riscos decorrentes da participação no projeto são moderados. O profissional que estará acompanhando as pacientes estará treinado e habilitado para fornecer informações referentes à pesquisa. O sangue será retirado por um profissional especializado podendo ocorrer a formação de um hematoma temporário devido à coleta de sangue. A equipe irá indicar medidas preventivas para que não ocorra a formação do hematoma. Caso ocorra, será indicada uma orientação médica para agilizar o processo de melhora do hematoma. Em relação à coleta do tecido placentário, existe um risco mínimo de sangramento adicional relacionado com a biópsia do leito placentário. No entanto, se necessário, uma sutura absorvível poderá ser usada para fechar o local. A técnica de sutura fica a critério do obstetra. Além disso, o protocolo de coleta prevê a obtenção de fragmentos com a menor intervenção possível, sendo realizado de maneira ágil e com o mínimo de interferência no procedimento cirúrgico pós-parto. Existe também o risco de quebra de confidencialidade, mas os resultados do projeto serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação das participantes do estudo. Além disso, cada pesquisador assinará o termo de compromisso de utilização de dados dos pacientes, responsabilizando-se pela quebra de sigilo intencional.

No futuro, essas características que estão sendo estudadas poderão auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia e facilitar o diagnóstico e tratamento desta doença. Em relação às análises das amostras de sangue e dos tecidos coletados, não trarão benefícios diretos para as participantes.

9. Referências Bibliográficas

1. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(6):323-33.
2. Bramham K, Parnell B, Nelson-Piercy C, Seed PT, Poston L, et al. Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014 Apr 15;348:g2301.
3. Roberts JM, August PA, Bakris G, Barton JR, Bernstein IM, Druzin M, et al. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122(5):1122-31.
4. World Health Organization (WHO). WHO Recommendation: Calcium Supplementation During Pregnancy for the Prevention of Pre-eclampsia and Its Complications. WHO; 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277235/9789241550451-eng.pdf>
5. Hipertensão na Gravidez: Relatório da Força-Tarefa ACOG sobre Hipertensão na Gravidez. 2013, Congresso Americano de Obstetras e Ginecologistas.
6. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L., Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. A classificação, diagnóstico e tratamento das doenças hipertensivas da gravidez: uma declaração revista do ISSHP . *Pregnancy Hypertens* 2014; 4 : 97–104.
7. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, Gülmezoglu AM, Temmerman M, Alkema L. Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2:e323–33.
8. Omotayo, M. O., Dickin, K. L., O'Brien, K. O., Neufeld, L. M., De Regil, L. M., & Stoltzfus, R. J. (2016). Calcium Supplementation to Prevent Preeclampsia: Translating Guidelines into Practice in Low-Income Countries. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 7(2), 275–278. doi: 10.3945/an.115.010736
9. Redman CW. Immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol*. 1991;15(3):257-62.
10. Serrano Díaz NC, Péz Leal MC, Martínez Linares MP, Casas Romero JP, Gil Urbano L, Navarro Mancilla AA. Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia. *MedUNAB*. 2002;5(15):185-92.
11. Gerretsen G, Huisjes HJ, Hardonk MJ, Elema JD. Trophoblast alterations in the placental bed in relation to physiological changes in spiral arteries. *Br J Obstet Gynaecol*. 1983;90(1):34-9.
12. Pacheco Romero J. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *An Fac Med (Perú)*. 2003;64(1):43-54.
13. Jesús GR, Jesús NR, Santos FC, Oliveira CS, Levy RA, Pôrto LCM, Klumb EM. Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e seu uso na prática obstétrica atual. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2014;13(3):26-32

14. Freire CMV, Tedoldi CL. Hipertensão arterial na gestação. *Arq Bras Cardiol*, 2009; 93(6 supl.1): e110-e178
15. Baschat AA, Magder LS, Doyle LE, et al. Prediction of preeclampsia utilizing the first trimester screening examination. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2014; 211:514.e1-7
16. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*, 2002; 19(1): 103–111
17. Seeland U, Brecht A, Nauman AT, Oertelt-Prigione S, Ruecke M, Knebel F, et al. Prevalence of arterial stiffness and the risk of myocardial diastolic dysfunction in women. *Biosci Rep*. 2016;36(5):pii:e00400.
18. Manisty C, Mayet J, Tapp RJ, Parker KH, Sever P, Poulter NR, et al. Wave reflection predicts cardiovascular events in hypertensive individuals independent of blood pressure and other cardiovascular risk factors: an ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial) substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(1):24-30.
19. Patwardhan E, Heffernan KS, Ryan J, Hession M, Warner P, Karas RH, et al. Augmentation index derived from peripheral arterial tonometry correlates with cardiovascular risk factors. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:253758.
20. Verdonk K, Visser W, Van Der Meiracker AH, Danser AHJ. The renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clinical Science*, 2014; 126: 537–544
21. Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 2012 April 1; 2(2): 72–83
22. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *ACGO Pract Bull*. 2002;(33):1-9.
23. Churchill D, Duley L. Interventionist versus expectant care for severe pre-eclampsia before term. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(31):CD003106.
24. Barbosa FT, Barbosa LT, Jucá MJ, Cunha RM. Usos do sulfato de magnésio em obstetrícia e em anestesia. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 2010; 60(1)
24. Redman CW, Sargent IL. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*, 2005; vol. 308
25. Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah ÁN, Torloni MR. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018, Issue 10. Art. No.: CD001059. DOI: 10.1002/14651858.CD001059.pub5.
26. Belizan JM, Villar J. The relationship between calcium intake and edema, proteinuria, and hypertension-gestosis: an hypothesis. *American Journal of Clinical Nutrition* 1980;33:2202-10.

27. Villar J, Repke JT. Calcium supplementation during pregnancy may reduce preterm delivery in high-risk populations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990;163:1124-31.
28. Carroli G, Merialdi M, Wojdyla D, Abalos E, Campodonico L, Yao SE, et al. Effects of calcium supplementation on uteroplacental and fetoplacental blood flow in low-calcium-intake mothers: a randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2010; Vol. 202:45.e1-45.e9.
29. Hofmeyr G, Duley L, Atallah A. Dietary calcium supplementation for prevention of pre-eclampsia and related problems: a systematic review and commentary. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* 2007;114(8):933-43.
30. Belizan JM, Villar J, Bergel E, del Pino A, Di Fulvio S, Galliano SV, et al. Long term effect of calcium supplementation during pregnancy on the blood pressure of offspring: follow up of a randomised controlled trial. *BMJ* 1997;315:281-5.
31. La and Inhibition of Potassium Current in Cerebral Vascular Smooth Muscle Is Dependent on Activation of Protein Kinase C. *The journal of biological chemistry*, 1997; 272 (43): 27345-52
32. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 Jun 21;123(24):2856-69. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853127. PMID: 21690502; PMCID: PMC3148781.
33. Leung, F. P., Yung, L. M., Yao, X., Laher, I., & Huang, Y. (2008). Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *British journal of pharmacology*, 153(5), 846–857. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707455>
34. Avila-Medina J, Mayoral-Gonzalez I, Dominguez-Rodriguez A, Gallardo-Castillo I, Ribas J, Ordoñez A, Rosado JA and Smani T (2018) The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front. Physiol.* 9:257. doi: 10.3389/fphys.2018.00257
35. Belén C, Santiago E, Sanchez A. Metabolic syndrome inhibits store-operated Ca^{2+} entry and calcium-release mechanism in Coronary artery smooth muscle. *Biochemical Pharmacology*, 2020, Vol 182, 114222. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114222

Apêndice I

Projeto: Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na fisiopatologia da pré-eclâmpsia

CheckList

Data: ____ / ____ / ____

Preenchimento de critérios de inclusão/ exclusão:

- Menor de 18 anos: [☐ Sim [☐ Não
- Diagnóstico prévio de nefropatia: [☐ Sim [☐ Não
- Diagnóstico prévio de hepatopatia: [☐ Sim [☐ Não
- Diagnóstico prévio de tireoidopatias: [☐ Sim [☐ Não
- Presença de infecções ativas: [☐ Sim [☐ Não
- Gestação múltipla: [☐ Sim [☐ Não
- Parto normal: [☐ Sim [☐ Não
- Síndrome Hellp: [☐ Sim [☐ Não
- Algum distúrbio de coagulação: [☐ Sim [☐ Não
- Placentação anômala: [☐ Sim [☐ Não

Obs.: Se todas as respostas acima forem “não” a paciente estará habilitada a participar do estudo.

Material para uso:	Procedimento realizado:
Aplicação TCLE: - Termo em branco - Caneta - Pasta para arquivo	Termo de Consentimento assinado: [☐ Sim [☐ Não Data: ____/____/____ Hora: ____:____
Coleta sanguínea: - Luvas - Algodão - Álcool - Seringa - Agulha - Curativo - Tubos sem anticoagulante	Coleta sanguínea <u>antes</u> do parto: [☐ Sim [☐ Não <u>Antes</u> de intervenção medicamentosa: [☐ Sim [☐ Não Data: ____/____/____ Hora: ____:____
Coleta placentária: - Luvas - Bisturi - Pinça - Tesoura - Eppendorfs - RNA Later - Tubos Falcon - Frascos com formol	Coleta de fragmento - Eppendorf: [☐ Sim [☐ Não Coleta de fragmento - Formol: [☐ Sim [☐ Não Coleta de fragmento - Falcon: [☐ Sim [☐ Não Data: ____/____/____ Hora: ____:____

Dados de identificação:

Paciente: _____

Nº das amostras: _____

Nº Atendimento: _____ Data nascimento: ____/____/____ Idade: ____

Alocar para grupo: ☐ Controle ☐ Pré-eclâmpsia leve
☐ _____ ☐ Pré-eclâmpsia grave

Obs.: Anexar este check-list preenchido ao TCLE.

Dados do parto:

IG: _____ Tipo de parto: ☐ PC ☐ PNSE ☐ _____

PNCE Indicação: _____

Data: ____/____/____ Hora: ____:____

Peso placenta: _____g

Macroscopia: _____

Dados Bebê:

Peso: _____g

Apgar: ____/____ Sexo: ☐ F ☐ M

Condição nascimento: ☐ RN vigoroso ☐ Outro: _____

Necessário reanimação: ☐ Não ☐ Sim

Diagnóstico: ☐ Normal ☐ Outro: _____

Clínica Médica:

Uso de medicações contínuas: ☐ Não ☐ Sim (quais): _____

Alergias: ☐ Não ☐ Sim (quais): _____

Cirurgias prévias: ☐ Não ☐ Sim (quais): _____

Abuso de álcool: ☐ Não ☐ Sim

Fumante: ☐ Não ☐ Sim

Usuária de drogas: ☐ Não ☐ Sim

Diagnóstico:

☐ HAS ☐ HAS gestacional ☐ DM ☐ DM gestacional

☐ PE leve ☐ PE grave ☐ HELLP

☐ Outros: _____

Medicações em uso:

☐ MgSO4 ☐ Ocitocina ☐ Ampicilina

☐ Outros: _____

Sinais Vitais:

ANTES do PARTO

Hora: ____:____

Temperatura: _____oC

FR: _____

FC: _____

PA máxima: _____

PA mínima: _____

APÓS o PARTO

Hora: ____:____

Temperatura: _____oC

FR: _____

FC: _____

PA máxima: _____

PA mínima: _____

Observações:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

CAAE: 40305720.2.3001.5327

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na fisiopatologia da pré-eclâmpsia**”, cujo objetivo é avaliar a função de alguns componentes moleculares do tecido uterino (proteínas relacionadas com o cálcio) no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, uma doença que altera negativamente, entre outras coisas, a pressão arterial da gestante e pode ocorrer no final da gravidez.

Este estudo está sendo realizado pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) em colaboração com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, como finalidade, ele pretende identificar alguns componentes placentários que podem estar envolvidos no desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

Caso aceite, sua participação consistirá em **autorizar a coleta de um pequeno fragmento da região do útero onde a placenta estava aderida, um pequeno fragmento da placenta fetal removida e uma amostra de sangue venoso**. A placenta - órgão que permite a nutrição de seu bebê enquanto está dentro do útero - é retirada no momento do parto independentemente da realização desta pesquisa e não é aproveitada usualmente para nenhum outro propósito.

Para organização deste estudo, se você tiver diagnóstico de pré-eclâmpsia, as suas amostras serão estudadas no grupo PRÉ-ECLÂMPسيا. Se você não tiver diagnóstico de pré-eclâmpsia, as suas amostras serão estudadas no grupo CONTROLE.

Logo após o processo de consentimento, antes do seu encaminhamento para o parto, será coletada uma amostra de volume aproximado de duas colheres de chá de sangue por punção venosa, normalmente coletada no seu braço ou onde encontra-se o acesso. Após o parto, depois do término de todos os procedimentos envolvendo o nascimento do seu filho, o médico em atendimento procederá a coleta de um pequeno fragmento da região do útero onde sua placenta estava fixada. A amostra terá o tamanho aproximado de um grão de amendoim, bem como da placenta fetal removida que será descartada. Também utilizaremos informações do seu prontuário como idade, valores de pressão arterial, sintomas e medicamentos que você utiliza, além de informações do seu bebê, como sexo, peso, comprimento, Apgar. Essas informações são importantes para avaliarmos se elas têm alguma relação com os dados moleculares que estamos estudando.

Todo o material biológico coletado será utilizado prioritariamente para as análises previstas neste projeto de pesquisa, a serem realizadas nos laboratórios de pesquisa da UFCSPA (exames de sangue e das amostras de tecido). Cabe salientar, que o material coletado não será armazenado. Em caso de necessidade, que pode acontecer apenas para aguardar a realização das análises previstas no estudo, o limite de tempo não passará de 5 anos. Caso haja necessidade de armazenamento, a equipe interessada poderá fazer uso destas amostras para novas pesquisas. No entanto, caso isso ocorra e se estiver interessada, novos projetos serão submetidos ao Comitê de Ética e você poderá ser novamente contatada, a fim de ser questionada se concorda ou não com o uso para esses novos estudos.

Os riscos ou desconfortos decorrentes da sua participação no projeto são moderados. O sangue será retirado por um profissional especializado. Pode ocorrer a formação de um hematoma temporário devido à coleta de sangue. Caso isso ocorra, será indicada uma

orientação médica para agilizar o processo de melhora do hematoma. Além disso, em relação à coleta do tecido placentário, existe um risco de sangramento adicional relacionado com a biópsia uterina. No entanto, se necessário, uma sutura absorvível pode ser usada para fechar o local. A técnica de sutura fica a critério do obstetra.

A coleta de amostras do seu útero será feita logo antes do término do procedimento cirúrgico, após a retirada da placenta, mas não haverá nenhuma interferência no seu atendimento ou no atendimento ao seu bebê. Caso a equipe identifique **qualquer situação de risco à sua saúde na cirurgia, mesmo com o termo de consentimento assinado**, a coleta será **imediatamente cancelada**.

Referente às informações obtidas nos prontuários, existe o risco de quebra de confidencialidade. No entanto, o profissional que coleta estas informações está capacitado e treinado para assegurar o sigilo dos dados de identificação pessoal. Os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participam do estudo.

Os possíveis benefícios decorrentes de sua participação poderão auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia e facilitar o diagnóstico e tratamento desta doença. Em relação aos resultados das análises feitas nas amostras de sangue e dos tecidos coletados, eles não trarão benefícios diretos para você.

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

A senhora é livre para decidir participar ou não do estudo e sua recusa ou desistência em qualquer momento da sua participação não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento em nenhuma das instituições participantes da pesquisa, nem para o seu tratamento com o seu médico. A senhora não terá nenhuma despesa para participar do estudo, porém não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação.

Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente da participação no estudo, os voluntários poderão pleitear indenização, segundo as determinações do Código Civil (Lei nº 10.406 de 2002) e das Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde. Além disso, a senhora receberá uma via deste termo de consentimento e outra via ficará guardada com os pesquisadores, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Caso a senhora tenha qualquer dúvida sobre o projeto, poderá contatar os pesquisadores responsáveis por este projeto pelos telefones:

- Profa. Dra. Gisele Branchini, da UFCSPA, no telefone (51) 3303.8753, endereço Rua Sarmento Leite, 245, Prédio 1, sala 308; email: giseleb@ufcspa.edu.br
- Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, no telefone (51) 3165.5831, endereço Rua Ramiro Barcelos, 910, CJ 905;
- Thaís Moura, da UFCSPA, no telefone (51) 3303.8753, endereço Rua Sarmento Leite, 245, Prédio 1, sala 308; email: thaism@ufcspa.edu.br

Este projeto foi revisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA e do HCPA, sendo que a senhora poderá entrar em contato com os CEP para esclarecimentos se assim desejar:

CEP UFCSPA: Rua Sarmento Leite, 245, Prédio 3, sala 407, ou pelo telefone (51) 3303.8804, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira. E-mail: cep@ufcspa.edu.br

CEP HCPA: Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, sala 2229, ou pelo telefone (51) 3359.7640, das 8h às 17h. E-mail: cep@hcpa.edu.br

- 1) Li e entendi todas as informações deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- 2) Tive oportunidade de ter todas as minhas dúvidas esclarecidas satisfatoriamente;
- 3) Concordo voluntariamente em participar deste projeto de pesquisa;
- 4) Compreendo que minha participação é voluntária e que tenho liberdade de sair do estudo em qualquer momento, independente do motivo e sem que isso interfira no meu cuidado médico;
- 5) Receberei uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado e datado.

_____ Concordo totalmente com o uso da amostra em caso da necessidade de armazenamento.

_____ Concordo parcialmente com o uso da amostra em caso da necessidade de armazenamento, desde que haja o contato prévio.

_____ Discordo totalmente com o uso da amostra em caso da necessidade de armazenamento.

Nome da Participante na Pesquisa: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Nome do Responsável por obter o TCLE: _____

Assinatura : _____ Data: ____/____/____

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Projeto de Pesquisa Científica

AValiação da Atividade Genotóxica e Citotóxica de Novas
Classes de Compostos de Coordenação Contendo Cu(II) com
Potencial Antitumoral

Proponente: Dra. Jenifer Saffi

Porto Alegre, março de 2023.

1. Dados de Identificação:

1.1. Título

Avaliação genética toxicológica de novas classes de compostos de coordenação contendo Cu(II) com potencial antitumoral

1.2. Coordenadora: Profa. Dra. Jenifer Saffi - Laboratório de Genética Toxicológica e Departamento de Ciências Básicas da Saúde

1.3. Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

1.4. Prazo de execução: 36 meses

2.5 Área do conhecimento: citotoxicidade, genotoxicidade, compostos de coordenação, câncer

2.6. Equipe:

- Coordenadora: Dra. Jenifer Saffi

Unidade: Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Bioquímica (UFCSPA)

Atividades no Projeto: orientação e supervisão dos alunos, apresentação de trabalhos, supervisão na redação dos manuscritos

- Pesquisadores envolvidos

- Dra. Adriana Castro Pinheiro

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Unidade: PPGQ - UFPel

Atividades no Projeto: supervisão dos alunos envolvidos na etapa de design, síntese, caracterização e estudos das espécies ativas em solução.

- Ms. Ianka Jacondino Nunes

Vínculo institucional: aluna de pós-graduação (Doutorado)

Instituição: UFCSPA

Unidade: PPG Biociências

Atividades no Projeto: execução dos testes *in vitro*, treinamento teórico e prático de novos alunos, organização de estoque de materiais, cotação de materiais, escrita de resumos e manuscritos e participação em eventos de divulgação científica.

- Ms. Wesley Vieira Ferreira
Vínculo institucional: bolsista, aluno de pós-graduação (Doutorado)
Instituição: UFPel
Unidade: PPGQ - UFPel
Atividades no Projeto: síntese e caracterização dos compostos
- Alunos de iniciação científica a serem selecionados

2. Caracterização do Problema

O câncer é um problema de saúde pública com impacto muito alto na sociedade moderna, sendo a segunda causa de morte por doenças no mundo [1]. A estimativa, em nível mundial, de 2018 a 2040, de todos os tipos de câncer, de ambos os sexos, de todas as idades é de um aumento de 63,4% [2, 3]. Para o Brasil, o câncer de pele não melanoma aparece como o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) [4]. A distribuição da incidência por região geográfica mostra que nas regiões Sul e Sudeste predominam os cânceres de próstata e mama feminino, bem como o de pulmão e de intestino [4].

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o acúmulo sequencial de mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA), onde estas alterações levam a uma proliferação celular rápida, anormal e descontrolada, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo [5]. Sendo que essas células apresentam a perda das suas funções básicas.

A quimioterapia é considerada a modalidade mais comum no tratamento do câncer, e sua ação atua por meio da utilização de compostos químicos, chamados de quimioterápicos [2]. Os quimioterápicos funcionam sozinhos ou em regimes de combinação, eliminando ou verificando a proliferação indesejada de células cancerosas.

A descoberta do composto inorgânico, cisplatina, foi ao acaso, mas graças a perspicácia e habilidades científicas de Barnett Rosenberg foi desenvolvido um dos mais eficientes agentes anticâncer da história [6]. O Platinol®, uma marca da cisplatina, foi aprovado em 1978 como uma terapia combinada no tratamento de câncer metastático

testicular, ovariano e da bexiga. O câncer de testículo, que matava cerca de 80% dos pacientes, passou a ser curável em 95% dos casos, quando diagnosticados na fase inicial [7]. Também é eficaz em tratamentos de câncer de cabeça e pescoço, cânceres pulmonares de células pequenas. No entanto, essa eficácia foi considerada limitada contra outros tipos de cânceres, causada por mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida. Além disso, a natureza de ligação não específica da cisplatina resulta em toxicidades sistêmicas graves, o que reduz a dosagem do fármaco e, conseqüentemente, sua potência. É amplamente reconhecido que a cisplatina interage com o DNA, gerando adutos e pontes entre as cadeias da dupla-hélice. Essas reações caracterizam-se por substituições nucleofílicas no DNA, o qual, quando modificado, interfere com processos essenciais para as células cancerígenas, como replicação e síntese de proteínas [8].

Inspirados na melhoria da eficácia dos medicamentos à base de platina(II), nas décadas seguintes, diversas propostas de novas metalodrogas surgiram. Destes, apenas alguns foram aprovados para uso clínico, incluem a carboplatina (2) e oxaliplatina (3), que obtiveram aprovação para uso mundial, enquanto nedaplatina (4), lobaplatina (5) e heptaplatina (6) obtiveram aprovação na Ásia (**Figura 1**).

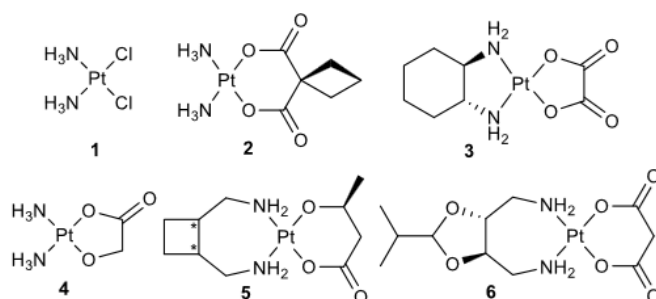


Figura 1. Estrutura química das Metalodrogas de platina aprovadas. (1) cisplatina, (2) carboplatina, (3) oxaliplatina, (4) nedaplatina, (5) lobaplatina, (6) heptaplatina.* indica centro quiral (S ou R) [9] .

Coletivamente, esses medicamentos de platina(II) são responsáveis por aproximadamente 50 – 70% do tratamento quimioterápico [10]. Um dos problemas comuns com muitos medicamentos aplicados no tratamento de quimioterapia do câncer, incluindo derivados de platina, é que atuam de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto benignas. Os medicamentos à base de platina, incluem fortes efeitos colaterais que enfraquecem o sistema imunológico, desencadeiam anemia e causam deficiência muscular, entre outros sintomas. Além disso, cânceres de vários tipos,

incluindo pulmão, colorretal e ovário, são intrinsecamente resistentes a agentes à base de platina [11].

Na quimioterapia do câncer, a busca por quimioterápicos que atuem seletivamente na morte ou inibição do crescimento das células neoplásicas, deixando as não tumorais intactas é o objetivo dos estudos atuais. Neste sentido, os complexos de metais de transição contendo metais bioessenciais, estão sendo ativamente explorados como classes alternativas de quimioterápicos e são considerados compostos promissores no combate ao câncer.

Os complexos de cobre são uma opção atraente como metalofármacos anticâncer, com base no fato de que metais endógenos como o Cu podem ser menos tóxicos para as células normais e, portanto, podem originar efeitos colaterais menos tóxicos. Esses compostos podem ter um mecanismo de ação diferente dos medicamentos clássicos de Pt e podem evitar a quimiorresistência adquirida aos medicamentos atualmente disponíveis [12].

Pesquisas indicam que os tecidos tumorais possuem concentração elevada de íons cobre em comparação com tecidos normais [13]. O desequilíbrio do cobre no câncer é confirmado por níveis elevados de cobre no mieloma múltiplo de estágio I [14], na leucemia linfoblástica aguda [15], câncer de pulmão [16], sarcoma de células reticulares, broncogênicos e carcinomas de células escamosas laríngeas, cervical, mama, estômago [17].

A constatação de que o cobre serve como um fator limitante para vários aspectos da progressão do tumor, incluindo crescimento, angiogênese e metástase, levou ao desenvolvimento de quelantes específicos de cobre como terapias para inibir esses processos [18]. Outra abordagem terapêutica utiliza ionóforos específicos que entregam cobre às células para aumentar os níveis de cobre intracelular [18, 19, 20]. Também sob investigação está o uso de cobre para substituir a platina em complexos de coordenação atualmente usados em quimioterapias convencionais. Entre os diferentes compostos de coordenação de cobre, houve uma miríade de atividades anticâncer atribuídas, incluindo a inibição de proteassoma, a produção de espécies reativas, as interações com DNA, a inibição de topoisomerasas, a indução de paraptose e apoptose [19].

Portanto, compostos de coordenação de Cu podem desempenhar papéis importantes na terapia anticâncer em combinação com drogas de platina. Por exemplo,

tratamento com metalotioneína pode potencializar os efeitos citotóxicos da oxaliplatina em linhagens de células de câncer colorretal humano via regulação positiva de CTR1[21]. Da mesma forma, o pré-tratamento com metalotioneína causa níveis aumentados de aduto de cisplatina e maior sensibilidade à cisplatina visando CTR1 no modelo de câncer cervical [22]. Além disso, metaloteína pode fortalecer a eficácia da cisplatina em camundongo, modelo de câncer de mama, diminuindo o nível de ATP7A [23]. Todos estes resultados apoiam que os compostos de coordenação de Cu funcionam como um quimiossensibilizador quando usado em combinação com drogas de platina.

Nos últimos anos, complexos de cobre mostraram sua eficácia antitumoral em modelos animais e dois complexos foram examinados em ensaios clínicos. Dos complexos de cobre examinados em ensaios clínicos, o Elesclomol (**Figura 2**), sintetizado como complexo de Cu(II), entrou em ensaio clínico da fase I para tratar a leucemia mielóide aguda, onde apresentou um perfil de segurança favorável, mas nenhum resultado na dose máxima de 400 mg/m² [24]. Também foi avaliado em um ensaio de fase II contra cânceres de ovário, faloúpio e peritoneais e demonstrou exercer atividade anticâncer como Cu(I) [25]. O Elesclomol liga-se ao Cu(II) no soro, que é reduzido a Cu(I) uma vez dentro das células cancerígenas, onde induz as rupturas da fita do DNA e catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em uma quantidade maior que em células não cancerígenas, explicando por que esse composto é mais citotóxico às células malignas do que às normais.

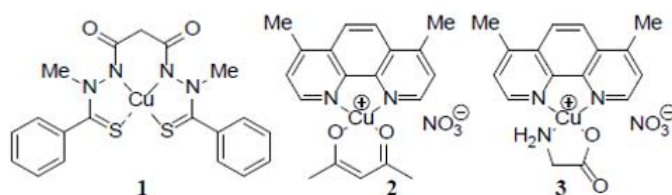


Figura 2. Cu(II) Elesclomol (1) Casiopeínas IIIa e II-Gly (2 e 3).

Outro composto de coordenação contendo cobre, Casiopeína IIIa também está em fase I clínica contra a leucemia mielóide aguda. Este agente induz a fragmentação do DNA e oxidação de base, indicando que o seu modo de ação envolve geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a redução do cobre, gerando alto estresse oxidativo na célula e levando à apoptose. Herández-Lemus et al. [26] demonstraram um análogo Casiopeína II-Gly, o qual bloqueia a migração e proliferação de células HeLa.

Desta forma, o metabolismo alterado das células cancerígenas e a resposta diferencial entre células normais e tumorais para o cobre são a base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas baseadas em complexos de cobre [27].

Nossos resultados preliminares nessa área de investigação mostraram que compostos de Cu(II) contendo ligantes monodentados pirazol-Se (composto **2a**) ou pirazol-S (composto **2b**) são promissores agentes antineoplásicos (**Figura 3**). O composto **2a** exibiu boa atividade citotóxica em relação a linhagens de células tumorais humanas em estudos de viabilidade celular. No entanto, **2a** não apresentou seletividade, com índice de seletividade de 1,12 – 1,40. O complexo **2b** foi seletivo para as linhas celulares de tumor humano MCF-7 com IC₅₀ de 59 ± 2 µM em 24 horas de tratamento (**Figura 4**).

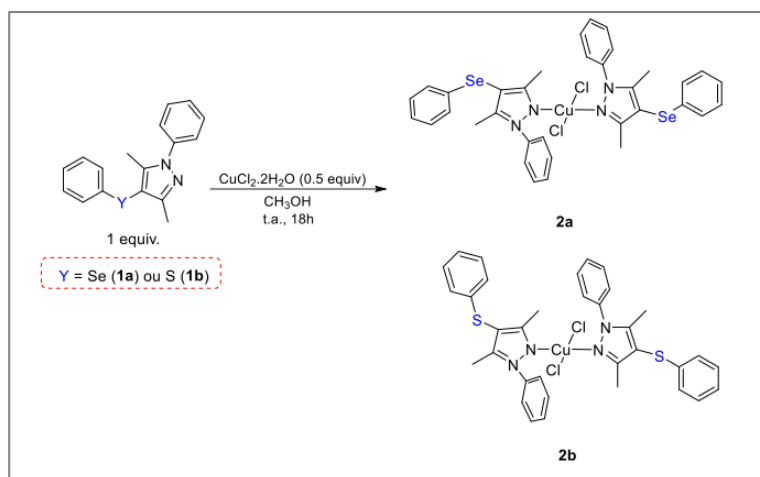


Figura 3. Complexos de Cobre(II) contendo 4-(arilcalcogenil)-1H-pirazóis.

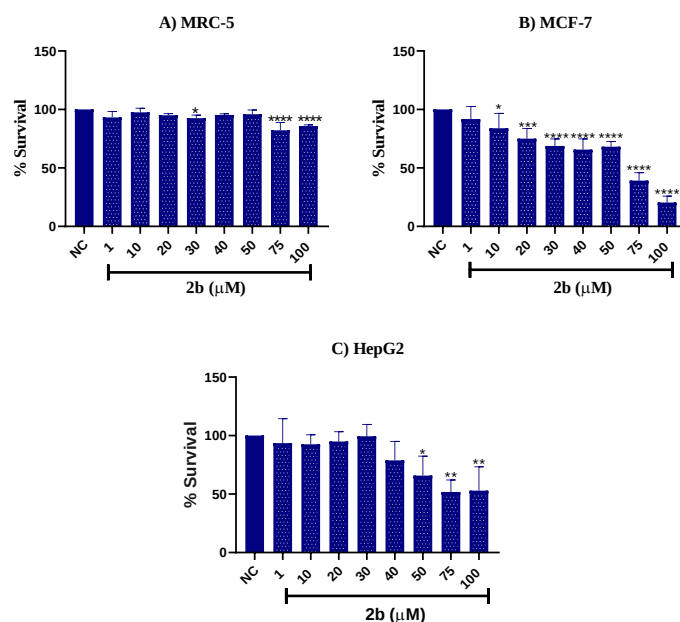


Figura 4. Viabilidade celular das linhagens MRC-5 (não-tumoral), MCF-7 (tumoral de mama) e HepG2 (tumoral de fígado) expostas ao compost **2b** (10 – 100 μM) for 24 h. Os valores representam a média e desvio-padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. NC representa o controle negativo (sem tratamento). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de pós-teste Dunnett, em que $p < 0,05$ foi considerado significativo. * $p = 0,0322$ (A); $0,0475$ (B) e $0,0422$ (C); ** $p = 0,0032$ e $0,0039$ (C); *** $p = 0,0009$; **** $p = <0,0001$ (A) e (B) em relação ao NC.

Este estudo foi recentemente publicado [28] e demonstra que os complexos Cu(II) **2a** e **2b** representam compostos antitumorais promissores, sendo necessários mais estudos para entender os mecanismos moleculares desses efeitos. Ainda, queremos ampliar a investigação do mecanismo de ação desses compostos em células tumorais de câncer de mama e analisar a combinação do composto Cu-PySe/Se com oxiliplatina e cisplatina.

Em outro trabalho, recentemente publicado em colaboração com o nosso grupo parceiro da UFPel, [29] avaliamos a citotoxicidade de novos complexos de Cu(II) contendo ligantes bases de Schiff, (compostos **2a** e **2b**, **Figure 5**). Estes complexos apresentaram potenciais atividades antioxidantes, antimicrobianos e anticâncer. A faixa de seletividade de diferentes linhagens tumorais humanas em relação a MRC-5 (linhagem celular normal humana) é pequena. Entendemos que devido ao potencial de complexos de Cu(II) contendo ligantes bases de Schiff, anteriormente descrito, estudos de genética toxicológica irão possibilitar um melhor entendimento do potencial farmacológico desses

compostos. Estudos preliminares demonstram que esses compostos são estáveis em solução aquosa e isso é interessante em termos de aplicabilidade clínica.

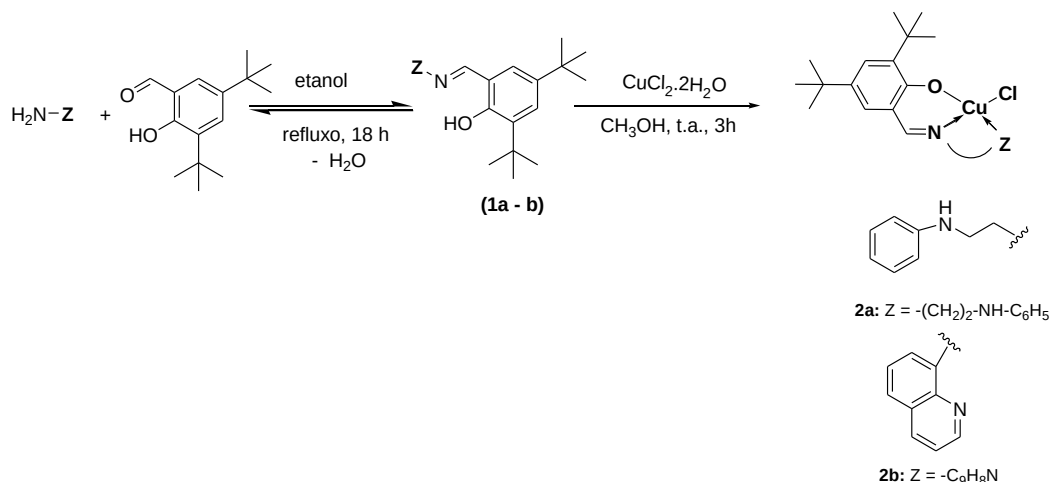


Figura 5. Roda de síntese dos complexos de Cu(II) contendo Bases de Schiff (2a e 2b).

Nossos colaboradores estão ampliando as classes de compostos que já estamos trabalhando, as quais apresentaram atividades biológicas relevantes para o desenvolvimento de novos protótipos com atividades antineoplásicas. O conhecimento gerado nessa proposta de pesquisa irá contribuir no direcionamento dos novos compostos.

Desta forma, esperamos que a relação da variação de parâmetros estruturais e estereoeletrônicos com o comportamento citotóxico e genotóxico desses compostos permita a descoberta de complexos metálicos com melhores propriedades farmacológicas, seja de forma isolada ou combinada com medicamentos em uso clínico.

3. Objetivos gerais

O projeto busca compreender o mecanismo de ação de novos compostos de coordenação contendo centro metálico de Cu(II) e avaliar o efeito da combinação desses compostos com quimioterápicos já utilizados na clínica, tais como cisplatina, oxaliplatina ou carboplatina em linhagens tumorais de câncer de mama e câncer colorretal.

3.1. Objetivos específicos e metas

- 1- Avaliação *in vitro* da reatividade de compostos de Cu(II) contendo ligantes derivados de Bases de Schiff. Meta: Estabelecer relações entre a estrutura do composto (fatores estéricos e eletrônicos, tipo de átomo doador, íon espectador, geometria) com a citotoxicidade, ampliando os estudos de viabilidade celular.

- 2- Avaliar a citotoxicidade do tratamento combinado do composto com quimioterápicos aprovados na clínica (cisplatina, carboplatina ou oxiplatina). Meta: medir se o efeito é sinérgico ou aditivo e em quais concentrações.
- 3- Avaliar a formação de colônias celulares após tratamento com o composto e cisplatina. Meta: medir a capacidade antiproliferativa dos tratamentos.
- 4- Avaliar a indução de morte celular após o tratamento de linhagens tumorais com o composto. Meta: Identificar se há presença de morte por apoptose.
- 5- Avaliar o perfil de ciclo celular após o tratamento com o composto. Meta: identificar parada de ciclo celular ou alteração de ploidia, pois são indicativos de lesão no DNA.
- 6- Verificar a genotoxicidade do composto em culturas de células através do ensaio cometa alcalino e cometa alcalino modificado com enzimas da via BER. Meta: identificar a presença de quebras no DNA e o recrutamento de reparo de lesões oxidativas pela via BER.
- 7- Avaliar se há recrutamento de proteínas de reparo de quebras duplas no DNA nas células tratadas com o composto. Meta: identificar formação de quebras duplas no DNA.
- 8- Avaliar se há ativação de proteínas que participam de sinalização ou reparo de DNA após o tratamento com o composto. Meta: medir a expressão proteica.
- 9- Avaliar se há formação de espécie reativa de oxigênio nas células tratadas com o composto. Meta: medir o acúmulo de ânion superóxido mitocondrial.

4. Metodologia

Síntese de compostos orgânicos derivados de bases de Schiff e os complexos de Cu(II):

A síntese, caracterização dos compostos orgânicos e inorgânicos será realizada pelo grupo parceiro da UFPel. O grupo conta com alunos de doutorado e mestrado e alunos de iniciação científica. O parque instrumental do CCQFA dispõe de cromatógrafo a gás com detecção espectrométrica de massas GC-MS-QP2010 Plus; espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian Inova 400 MHz, espectrofotômetro UV-Visível Lambda 25/PERKN ELMER, Espectrofotômetro IR Affinity-1 Shimadzu, entre outros.

Avaliação da atividade antitumoral e mecanismos de morte celular: Estudos *in vitro* em linhagens celulares imortalizadas de mamíferos para estimar a atividade citotóxica, antiproliferativa e mutagênica, caracterizar os mecanismos de morte celular estudar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de novas classes de complexos de Cu(II) isolados e em

combinação com compostos platinados utilizados na clínica (cisplatina/carboplatina) em diferentes culturas de células normais e tumorais. Ainda, análise do perfil de segurança *in vitro* – citotoxicidade e genotoxicidade em células V79.

Número de registro e data da publicação do Certificado de Qualidade em Biossegurança: O laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, apresenta Certificado em Qualidade de Biossegurança – CQB Nível I (número 423/2016), de 11 de outubro de 2016.

Cultura Celular: Serão utilizadas as linhagens de células de fibroblastos de hamster chinês (V79), e de fibroblastos humanos de pulmão (MRC5), carcinoma colorretal (SW620), adenocarcinoma de mama (MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-21). As células foram adquiridas da ATCC (American Tissue Culture Collection) e serão cultivadas sob condições padrão a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A linhagem MCF7 será cultivada em meio RPMI com 20% de soro fetal bovino (composto por fatores de crescimento que estimulam a duplicação celular), 0,2 mg/mL de L-glutamina, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As demais linhagens serão cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e os demais fatores nas mesmas concentrações já mencionadas.

Ensaio de viabilidade celular (determinação da citotoxicidade): A viabilidade celular será determinada por técnicas laboratoriais, como o teste de exclusão de Trypan Blue, que determina a viabilidade através do dano à membrana celular, o ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que mede a função mitocondrial da célula, ou seja, avalia o nível de funcionalidade da célula e não de sua estrutura, e pelo ensaio de captação do corante vermelho neutro (VN). O ensaio VN é baseado na incorporação do corante VN pelos lisossomos de células viáveis. Estes ensaios são utilizados para medir os resultados da proliferação de células, verificar efeitos citotóxicos de compostos e para multiplexagem, como um controle interno de determinação do número de células viáveis. No estudo serão usadas linhagens celulares imortalizadas de mamíferos:

- MRC5 (fibroblastos de pulmão humano);
- SW620 (carcinoma colorretal);
- Usaremos três linhagens de adenocarcinoma de mama de classificações diferentes: MCF-7 (apresenta receptores de ER e PR e é do subtipo luminal-A. SKBR-3 não

apresenta os receptores ER e PR e apresenta HER2, sendo, portanto do subtipo HER2. Já MDA-MB-231 é uma linhagem triplo negativo, isto é, não apresenta os receptores ER, PR ou HER2).

Após o tratamento com diferentes concentrações dos complexos de Cu(II) e estes complexos combinados com compostos platinados, e diferentes tempos de tratamento, as células serão lavadas com PBS e incubadas com 250 µL da solução de VN (25 µg/mL) a 37 °C por 3 h. Depois disso, as células serão lavadas novamente com PBS e incubadas 30 min, protegidas da luz, com a solução de desadsorção (ácido acético:etanol:água, 1:50:49). A absorbância será medida a 540 nm em espectrofotômetro. A avaliação da viabilidade também será feita através da coloração com azul de trypan. Após os tratamentos, as células serão lavadas com PBS, diluídas e misturadas com azul de trypan (0,4 %). As células serão aplicadas em uma câmara de Neubauer e, a concentração celular e a viabilidade serão determinadas utilizando o equipamento Countess (Invitrogen). O ensaio MTT será realizado empregando metodologia de acordo com Huang et al.[30].

Com esses ensaios será possível determinar os valores de IC₅₀ (concentração inibitória mínima para matar 50% das células) e o índice de seletividade para as células tumorais, o qual consiste na divisão do IC₅₀ das células tumorais pelo IC₅₀ das células normais. Todos os valores obtidos serão uma média de três experimentos independentes.

A partir desse ensaio serão selecionados os complexos de Cu(II) mais promissores e suas respectivas linhagens celulares para dar prosseguimento nas demais avaliações.

Avaliação da citotoxicidade pela capacidade de formação de colônias (sobrevivência clonal): O ensaio de sobrevivência clonogênica será conduzido para determinação do efeito antiproliferativo dos compostos testados. Após os tratamentos as células serão lavadas com PBS e cultivadas durante 7-12 dias. As colônias serão fixadas com metanol e ácido acético (3:1), coradas com cristal violeta (1% em PBS), contadas e a sua sobrevivência calculada como uma percentagem em relação à sobrevivência dos controles negativos.

Análise de atividade genotóxica e antigenotóxica por ensaio cometa (detecção a dano ao DNA): O teste cometa alcalino será desenvolvido conforme descrito em 1988 por Singh et al. [31]. Uma cultura de células descritas no item 5.5.1 será tratada com concentrações crescentes das substâncias-teste, composto puro, na ausência e na presença

de peróxido de hidrogênio durante 24 horas. Ao final do tratamento, 20 µL da suspensão celular ($\sim 10^6$ células mL⁻¹) são dissolvidos em agarose de baixo ponto de fusão e as células são espalhadas sob uma lâmina de vidro contendo pré-cobertura de agarose. As células são lisadas em um tampão específico (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton e 10% DMSO) por, no mínimo, 1 hora e no máximo duas semanas a 4° C. As lâminas são dispostas em uma cuba horizontal para eletroforese contendo um tampão alcalino (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA, pH 13) por 20 minutos a 4° C. Uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) é aplicada durante 15 minutos. As lâminas contendo as amostras são neutralizadas (0,4 M de Tris.Cl, pH 7,5) e fixadas (15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco e 5% de glicerol) para posterior coloração. A coloração é realizada através da utilização de uma solução contendo nitrato de prata (A: 5% de carbonato de sódio; B: 0,1% de nitrato de prata, 0,25% de ácido tungstosilísico e 0,15% de formaldeído). Após este procedimento, aplica-se sobre as lâminas uma solução de ácido acético a 1% e lava-se as lâminas para a posterior contagem dos cometas.

Na versão do cometa modificado com enzimas, são utilizadas enzimas de reparo de origem bacteriana no protocolo do cometa alcalino. As enzimas utilizadas serão a Endonuclease III (Endo III) ou Formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG), as quais convertem pirimidinas oxidadas em quebras na fita de DNA, que também podem ser visualizadas através da migração do material genético pela corrente de eletroforese. Neste caso, após a lise cada lâmina será lavada por 5 minutos em um tampão enzimático (40 mM HEPES-KOH, 1 M KCl, 5mM EDTA, 2.5 mg/mL albumina sérica, pH 8,0) seguido por uma incubação com as enzimas por 45 minutos a 37 °C. Os passos subsequentes serão os mesmos já descritos acima.

Analisa-se as lâminas em microscópio óptico através da classificação em quatro classes de danos, de acordo com o tamanho do cometa formado (0 a 4). Serão analisadas pelo menos 100 células por tratamento e os experimentos serão realizados em triplicata. Os danos podem ser identificados de diferentes maneiras, uma delas é medir o comprimento do DNA migrado com a ajuda de uma ocular de medidas, outra é classificar visualmente as células com dano em diferentes classes, podendo obter um valor arbitrário que expresse o dano geral que uma população de células sofreu.

Avaliação de ciclo celular: A cinética do ciclo celular das células expostas às diferentes condições de tratamentos será avaliada por análise de citometria de fluxo com coloração nuclear com iodeto de propídio.

Ensaio para a determinação de apoptose: Após os tratamentos as células serão lavadas em PBS e incubadas com PE-Annexin V e 7-AAD por 15 minutos em temperatura ambiente e em seguida analisadas por citometria de fluxo, conforme instruções do fabricante (BD Biosciences).

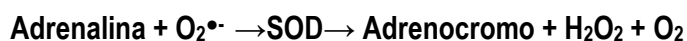
Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$): O potencial transmembrânico da mitocôndria será determinado pela retenção mitocondrial da rodamina 123 nas células tumorais, por citometria de fluxo.

Detecção de caspases 3, 7, 8 e 9 clivadas por citometria de fluxo: Após o tratamento, as células serão marcadas com os anticorpos anti caspases 3, 7, 8 e 9 clivadas e conjugados a FITC (BD Pharmingen, USA) em tampão Perm/Wash™ (BD Pharmingen, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células com caspases clivadas será determinada por meio do programa CellQuest (Becton Dickinson) em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência.

Western blot: Os extratos proteicos das linhagens tratadas e não tratadas com diferentes doses e tempos de incubação com os agentes, serão preparados conforme descrito em *Dumaz et al.* (1997). As proteínas específicas serão reveladas com os anticorpos específicos, como anti- γ H2AX, anti-Chk1, Chk2, ATM e ATR e anti-B-actina. As reações prosseguirão com a incubação com os anticorpos secundários específicos, seguida por reação com quimioluminescência, de acordo com as instruções do fornecedor (Amersham Biosciences).

Atividades Catalase-like e SOD-like: Para a determinação das atividades enzimáticas, primeiramente as células serão plaqueadas e tratadas com os valores de IC₅₀ dos complexos e após 24 h de tratamento serão preparados os extratos proteicos. O extrato proteico será utilizado para determinação das atividades enzimáticas. A concentração de proteínas será determinada através do método de Lowry. Estes ensaios empregando os complexos para determinar atividades semelhantes a Catalase serão testados quanto à capacidade de degradação de H₂O₂. O ensaio será realizado de acordo com o método descrito por Aebi [32]. Seu princípio é baseado na determinação da taxa de decomposição

do H_2O_2 a 240 nm. A reação é conduzida a temperatura constante (30 °C) por 1 minuto. Uma unidade de catalase decompõe 1 mol de H_2O_2 por mg de proteína em 1 minuto a pH 7,4. A técnica para a determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com a adrenalina. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de oxidação da adrenalina. A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente, observada a 480 nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH e adrenalina.



Reagentes:

- 1) Tampão Glicina 50 mM pH 10,2 (ajustar com NaOH); PM 75,07; Manter a 30°C para a experiência.
- 2) Catalase 10 mM; PM 250; Em água milliQ.
- 3) Adrenalina 60 mM (diluir imediatamente antes de pipetar), PM 183,2, Em água milliQ acidificada (1% de HCl 37%).

Setagem do espectramax M2e: - Modo Cinético; - Leituras de 36 em 36 segundos durante 15 minutos.

Análise estatística

O tamanho amostral será de no mínimo três experimentos independentes para cada técnica. Os dados serão analisados através do programa Prizm (Graphpad Instat – NIH) utilizando o teste ANOVA (Analysis of Variance) one ou two-way dependendo da variável em questão, seguido pelo post-hoc de Tukey ou pelo teste t. Resultados serão considerados estatisticamente diferentes quando apresentarem um $p < 0,05$. Os dados serão apresentados com média e desvio padrão.

5. Resultados esperados

Ao final deste trabalho esperamos identificar o mecanismo de ação de uma nova classe de compostos de coordenação contendo centro metálico de cobre, sintetizada pelo nosso grupo parceiro da UFPel e que já mostrou ter atividade antitumoral seletiva, isto é,

afeta mais as células tumorais do que célula não tumoral. Ao compreender o mecanismo de ação desses compostos inovadores, poderemos direcionar potenciais aplicações de seu uso e de compostos semelhantes, ampliando a classe de compostos. Além disso, avaliaremos se há benefícios na combinação com quimioterápicos a base de platina utilizados em tratamentos clínicos atualmente. Por fim, o estudo aprofundado do efeito molecular desses compostos auxiliará no desenvolvimento de novos compostos de coordenação com cobre.

Este trabalho gerará conhecimento em pesquisa básica e compreende uma equipe multidisciplinar na investigação e desenvolvimento de novos compostos com atividade antineoplásica. A proposta, aqui apresentada, poderá gerar um novo fármaco para investigação clínica e poderá otimizar o uso de medicamentos já existentes no sistema de saúde, além de auxiliar na descoberta de novos tratamentos.

A formação de recursos humanos especializados como alunos de iniciação científica e de pós-graduação é uma parte extremamente importante do projeto. Esperamos contribuir cientificamente em conjunto com os alunos de pós-graduação e graduação envolvidos no projeto, divulgando o material científico (resumos em congressos nacionais e internacionais e artigo de dados). Incentivaremos a participação em congressos nacionais e internacionais da área de interesse. Contribuiremos no desenvolvimento científico, tecnológico e econômico regional, visando à difusão do conhecimento, através de novas pesquisas sobre a descoberta de novos medicamentos potenciais para a terapia do câncer. Promoveremos a integração acadêmica entre a UFPel e UFCSPA.

7. Cronograma

Ano	2023				2024				2025
Mês ou Trimestre (T)	Março	2º T	3º T	4º T	1º T	2º T	3º T	4º T	Janeiro e fevereiro
Atividade 1 (objetivo específico 1)									
Atividade 2 (objetivo específico 2)									

Resultado esperado: Seleção dos compostos com melhor reatividade e citotoxicidade e com propriedades moleculares interessantes para uma possível aplicação clínica.									
Atividade 3 (objetivos específicos 3 e 4)									
Atividade 4 (objetivo específico 5)									
Resultado esperado: Medir o efeito antitumoral do composto e da combinação dele com a Cisplatina para saber se há sensibilização das células à cisplatina.									
Atividade 5 (objetivo específico 6)									
Atividade 6 (objetivo específico 7)									
Atividade 7 (objetivo específico 8)									
Atividade 8 (objetivo específico 9)									
Resultado esperado: Compreender se o composto induz lesões de quebras simples e duplas no DNA e se há ativação de vias de reparo de DNA.									
Atividade 9 (objetivo específico 10)									
Resultado esperado: Compreender se o composto exerce atividade por meio da formação de espécies reativas de oxigênio.									
Atividade 10 (objetivo de manter as atividades no laboratório)									
Atividade 11 (objetivo de ensinar novos alunos)									
Atividade 12 (objetivo de divulgar ciência)									
Resultado esperado: Manutenção das atividades do laboratório, propagação do conhecimento teórico e prático para demais alunos, elaboração de artigo e divulgação científica.									

8. Referências Bibliográficas

1. Disponível em <<https://ourworldindata.org/cancer>>. Acesso em: 20, 02, 2023>.
2. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em 20,02,2023.
3. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em: 20, 02, 2023.
4. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>>. Acesso em: 20,02, 2023.
5. A. Bouafia, S. Corre, D. Gilot, N. Mouchet, S. Prince, M.-D. PLoS Genet. 10 (5) (2014) e1004309.
6. (a) B. Rosemberg, L. VanCamp, T. Krigas. Nature. 205 (1965) 698. (b) F. Arnesano, G. Natile. Coord Chem Rev. 253 (2009) 2070.
7. Y. Jung, S.J. Lippard. Chem Rev. 107 (2007) 1387.
8. (a) S.M. Cohen, S.J. Lippard. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 67 (2001) 93. (b) V.L. De Almeida, A. Leitão, L.C.B. Reina, C.A. Montanari, C.L. Donnici, M.T.P. Lopes, Quim. Nova. 28(1) (2005) 118.
9. L. Cai, C. Yu, L. Ba, Q. Liu, Y. Qian, B. Yang, C. Gao. Appl. Organometal. (2018) e4228.
10. Y.-X. Liu, H.-W. Mo, Z.-Y. Lv, F. Shen, Ch.-L. Zhang, Y.-Y. Qi, Z.-W. Mao, L. Xue-Yi. Transit Met Chem. 43 (2018) 259.
11. T. W. Hambley. Science. 318 (5855) (2007) 1392.
12. (a) C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato. Chem Rev. 114 (2014) 815. (b) D.A. da Silva DA, De Luca A, R. Squitti, M. Rongioletti, L. Rossi, C.M.L. Machado, G. Cerchiaro. J. Inorg. Biochem. 226 (2022) 111634.
13. R. Tabti, N. Tounsi, C. Gaiddon, E. Bentouhami, L. Désaubry. Med Chem. 7(5) (2017) 875.
14. M.H. Khadem-Ansari, M. Asoudeh, H.F.K. Gheshlaghi, et al., Horm Mol Biol Clin Investig. 37 (2018) 3.
15. C. Akhgarjand, K. Djafarian, H. Rezvani, E. Azargashb, M. Vafa. Am J Blood Res. 8 (2018) 21.
16. X. Zhang, Q. Yang. J Int Med Res. 46 (2018) 4863.
17. A. Gupte, R.J. Mumper. Cancer Treat Rev. 35 (2009) 32.
18. S. Majumder, P. Dutta, S. K. Choudhuri. Medicinal Chemistry. 1 (2005) 563.
19. Y. Li. IUBMB Life. 72 (2020) 1900.
20. D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M.A. Cater. Metallomics. 7(11) (2015) 1459.

21. (a) Y.Q. Li, J.Y. Yin, Z.Q. Liu, X.P. Li. *IUBMB Life*. 70(3) (2018) 183. (b) R. Petruzzelli, R.S. Polishchuk. *Cells*. 8(9) (2019) 1080. (c) M. Kakuda, S. Matsuzaki, Y. Ueda, M. Shiomi, S. Matsuzaki, T. Kimura, M. Fujita, T. Egawa-Takata, E. Kobayashi, S. Serada, K. Yoshino, T. Naka, T. Kimura. *Am J Obstet Gynecol*. 222(1) (2020) 64.
22. H. Cui, A.J. Zhang, M.J. McKeage, L.M. Nott, D. Geraghty, N. Guven, J.J. Liu. *J Inorg Biochem*. 177 (2017) 249.
23. S. Ishida, F. McCormick, K. Smith-McCune, D. Hanahan. *Cancer Cell*. 17(6) (2010) 574.
24. T. Pivetta T, V. Lallai, E. Valletta, F. Trudu, F. Isaia, D. Perra, E. Pinna, A. Pani. *J. Inorg. Biochem*. 151 (2015) 107.
25. D. Hedley, A. Shamas-Din, S. Chow, D. Sanfelice, A.C. Schuh. *Leuk Lymphoma*. 57 (2016) 2437.
26. Disponível em:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00888615?term=Elesclomol&rank=3>. Acesso em 20/02/2023.
27. J. Espinal-Enríquez, E. Hernández-Lemus, C. Mejía L. Ruiz-Azuara. *Front Physiol*. 6 (2015) 406.
28. A.C. Pinheiro, F.F. Busatto, B.T. Schaefer, P.P. Tomasini, I.J. Nunes, T. Dos S. Machado, R. Cargnelutti, T.F.B. de Aquino, K. De Q. Ferreira, A.M. Casaril, R.G. Jacob, L. Savegnago, D. Hartwig, J. Saffi. *J. Inorg. Biochem*. 237 (2022) 112013.
29. A.C. Pinheiro, I.J. Nunes, W.V. Ferreira, P.P. Tomasini, C. Trindade, C.C. Martins, E.A. Wilhelm, R.S. Oliboni, P.A.. Netz, R. Stieler, O.L. Casagrande Jr.; J. Saffi, J. *Pharmaceutics*, 15 (2023) 376.
30. F.-M Huang, S.-F Yang, J.-H. Zhao, Y.-C Chang. *J Endod*. 36(10) (2010) 1628.
31. N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Scheider. *Exp. Cell Res*. 175 (1988) 184.
32. a) W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset. *Lebensm. Wiss Technol*. 28 (1) (1995) 25. b) V. N. Castelo-Branco, A. G. Torres. *Rev Nutr*. 24 (2011) 173.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE -
UFCSPA

Projeto de Pesquisa

**Desenvolvimento e aplicação de novos dispositivos baseados em impressão 3D para
utilização em técnicas de microextração**

Coordenador: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Porto Alegre, março de 2024.

Resumo

Atualmente, há uma série de dados que evidenciam o aumento da quantidade de contaminantes nos corpos hídricos em função do descarte incorreto e da falta de um eficiente tratamento de efluentes, podendo causar sérios problemas à saúde humana. Entre estes contaminantes, encontram-se os agrotóxicos que geralmente são utilizados em larga escala e sem os devidos cuidados no seu descarte e utilização. O presente projeto engloba o desenvolvimento de uma metodologia analítica inovadora baseada em uma técnica de microextração para a determinação de agrotóxicos em águas superficiais. Especificamente, está sendo proposta uma metodologia analítica sustentável para a extração de agrotóxicos de diferentes classes (organoclorados e organofosforados) em amostras de águas superficiais utilizando a técnica de extração sortiva em disco rotativo (RDSE), sendo que os dispositivos cilíndricos sorventes serão confeccionados mediante impressão 3D, representando uma grande inovação na área. A separação e quantificação dos analitos será realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). O método será totalmente otimizado empregando planejamentos experimentais multivariados, validados conforme guias de validação vigentes e aplicados a amostras reais obtidas de diferentes regiões. A metodologia proposta é baseada em uma técnica de preparo de amostras moderna e mais sustentável quando comparada às técnicas comumente usadas para a determinação destes contaminantes. Algumas vantagens esperadas estão o baixo consumo de amostra, reduzido volume de solvente orgânico, baixa geração de resíduos, menor tempo de extração e simplicidade de aplicação. Além disso, acredita-se que as fases extratoras sintetizadas serão bastante seletivas para estes analitos, possibilitando a obtenção de baixos limites de detecção e quantificação.

Palavras-chave: agrotóxicos, RDSE, Impressão 3D, preparo de amostra, sustentabilidade.

Dados do proponente e equipe

Título do projeto: Desenvolvimento e Aplicação de Novos Dispositivos Baseados em Impressão 3D para Utilização em Técnicas de Microextração

- Coordenador: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib – Líder do Grupo de Estudos em Preparo de Amostras e Cromatografia (GEPAC) UFCSPA certificado no diretório de grupos do CNPq (dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/8474362370071545).

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

- Colaboradora: Prof. Dr. Monique Deon (UFCSPA)

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6021445976296111>

- Colaboradora: Ms. Camila Scheid (Doutoranda PPG-Biociências UFCSPA)

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5260534343210314>

- Colaboradora: Sofia Aquino Monteiro (Mestranda PPG-Biociências UFCSPA)

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2456591273336518>

Caracterização da proposta

Com a finalidade de aproximar a comunidade em geral do ambiente acadêmico, torna-se indispensável que os projetos de pesquisa atendam as reais necessidades da população. Neste contexto, este projeto de pesquisa está direcionado para o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica inovadora, eficiente e ambientalmente amigável para a determinação de contaminantes ambientais em amostras de águas superficiais, representando uma ferramenta útil para a avaliação destes compostos em corpos hídricos.

As técnicas tradicionais de preparo de amostra, como a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), são as mais conhecidas e amplamente utilizadas para esse tipo de análise, mas estão associadas a um grande consumo de amostra e solventes orgânicos, além de serem técnicas demoradas e com significativa geração de resíduos. Em função disto, uma tendência moderna é o desenvolvimento de novos métodos e tecnologias de extração capazes de simplificar e miniaturizar os procedimentos analíticos, além de diminuir o consumo de solventes orgânicos, corroborando com os conceitos da Química Verde.

O lançamento de efluentes domésticos e industriais nos corpos hídricos introduzem inúmeras substâncias químicas com potencial efeito deletério aos seres vivos, entre elas os compostos denominados contaminantes emergentes. Estas substâncias são decorrentes de diversas fontes como produtos químicos industriais, pesticidas, drogas ilícitas, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, hormônios e análogos sintéticos, além de seus produtos de biotransformação [1,2].

Os contaminantes emergentes não são necessariamente novas substâncias químicas, podendo ser substâncias presentes há muito tempo no meio ambiente, cuja existência não era identificada anteriormente [3]. Estes poluentes são definidos, portanto, como contaminantes que atualmente não estão incluídos nos programas de monitoramento de rotina e que podem ser candidatos à regulamentação futura [4,5]. Nos últimos anos foram publicadas revisões relacionadas à distribuição de contaminantes emergentes nas águas continentais brasileiras, demonstrando tratar-se de um problema de grande relevância ambiental, visto que muitos destes compostos não são removidos em sua totalidade nos sistemas de tratamento de efluentes convencionais [6,7].

O desenvolvimento de metodologias capazes de quantificar analitos em matrizes complexas é considerado um grande desafio. Especificamente na análise de amostras ambientais, a complexidade da matriz e a baixa concentração dos analitos tornam, na maioria das vezes, necessária uma etapa de preparo de amostras anterior à análise instrumental [8]. Os principais objetivos da etapa de preparo de amostra são reduzir ou eliminar possíveis interferentes da matriz, isolar os analitos, concentrá-los para análise de traços e tornar possível a introdução da amostra no equipamento que fornecerá os dados analíticos. A etapa de preparo de amostras é de fundamental importância e é considerada a mais crítica de uma análise química, em função do risco de perda de analitos, contaminação da amostra e por ser a etapa mais demorada dos procedimentos analíticos [9,10].

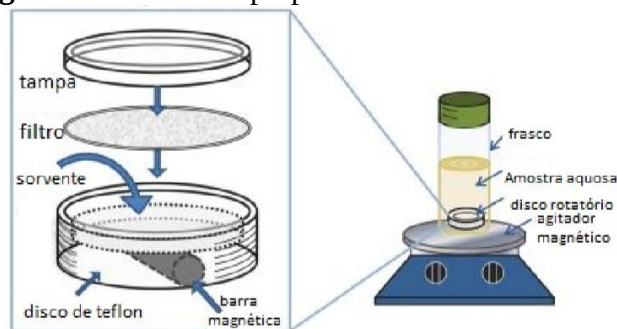
Considerando a preocupação mundial com a sustentabilidade, aliado ao aumento da sensibilidade dos instrumentos analíticos, a química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação e miniaturização dos processos [11,12]. Algumas características, incluindo baixo consumo de solvente, alta eficiência de extração e a possibilidade de automação, tornam as técnicas de microextração valiosas alternativas aos procedimentos de extração clássicos. Entre as diversas técnicas de microextração

disponíveis atualmente, grande parte são baseadas no uso de materiais sorventes (sólidos) [12,13].

Uma tendência nessa área é a utilização de fases extratoras alternativas em técnicas de microextração, sendo que a grande vantagem dessa abordagem é a possibilidade de utilização de fases extratoras específicas para um grupo de analitos, trazendo uma melhora na seletividade, exatidão e precisão, além de baixos limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs) para o método analítico [14].

Uma interessante técnica de extração miniaturizada baseada em materiais sorventes é a extração sortiva em disco rotativo (RDSE, do inglês *Rotating Disk Sorptive Extraction*), que foi proposta pela primeira vez no ano de 2009. O dispositivo de extração consiste em um disco de Teflon ao qual uma barra de agitação magnética é incorporada. A fase sorvente (geralmente formada por polidimetilssiloxano) é aderida à superfície superior e o aparato é submetido à agitação magnética, conforme **Figura 1**. Esta técnica permite grande superfície de contato entre o sorvente em forma de disco e a amostra, facilitando o processo de extração [15,16].

Figura 1. Técnica de preparo de amostras RDSE.



Fonte: Adaptado de [17].

Nos últimos anos, a manufatura aditiva (MA), também chamada de impressão 3D, surgiu como uma valiosa tecnologia para o avanço no campo de preparo de amostras, permitindo a rápida confecção de dispositivos e facilitando o desenvolvimento de métodos automatizados [17]. A impressão 3D é considerada um processo aditivo de prototipagem rápida na qual um objeto é construído tridimensionalmente a partir de um modelo digital, onde são adicionadas finas camadas de material, possibilitando a confecção de objetos de formatos diversos. Esta tecnologia vem ganhando popularidade devido à sua capacidade de imprimir protótipos de forma simples, com boa precisão geométrica e sem a necessidade de pós-processamento, viabilizando a sua aplicação em diversas áreas, entre elas a química analítica [17-19]. A impressão 3D é uma tecnologia que possibilita a fabricação de materiais analíticos com características inéditas, sendo que já foi utilizada para a confecção de fases estacionárias para cromatografia [20], detectores [21], sensores [22] e dispositivos utilizados no preparo de amostras [23].

Com relação às técnicas de impressão 3D, a modelagem por fusão e deposição (FDM do inglês *fused deposition modelling*) é a mais utilizada e é caracterizada pela extrusão aquecida de material termoplástico, sendo que são depositadas subsequentes camadas deste material até a conclusão do objeto desejado. Uma grande vantagem deste processo é a possibilidade de utilização de diversos tipos de materiais poliméricos, o que permite um direcionamento maior para o uso do experimental em questão [18,24].

A utilização de materiais impressos em 3D para extrações em fase sólida a partir de filamentos comerciais convencionais – como poliestireno (PS, do inglês *polystyrene*) e o copolímero acrilonitrila butadieno estireno (ABS, do inglês *acrylonitrile butadiene*

styrene) - é limitada, em função da composição destes. No entanto, há a possibilidade realizar modificações nessas fases extratoras, proporcionando melhoria na seletividade dos compostos extraídos [18]. A impressão 3D é uma promissora técnica de fabricação, capaz de acelerar novos desenvolvimentos no campo da análise química. A sua aplicação em técnicas miniaturizadas de extração ainda é pouco explorada, representando um campo promissor a ser avaliado.

Sendo assim, neste trabalho serão sintetizados e produzidos novos filamentos para impressão 3D baseados em sílica modificada, e também em filamentos comerciais que permitirá a confecção de um novo dispositivo para RDSE. Este dispositivo será impresso e avaliado como fase extratora para a determinação de agrotóxicos em amostras de água superficial com o intuito de monitorar a contaminação por estes compostos. Neste caso, uma significativa inovação será o desenvolvimento de um dispositivo para RDSE sem a necessidade do filme de PDMS tipicamente encontrado em dispositivos atuais. Esse fato ampliará a aplicabilidade desta técnica sustentável, bem como permitirá a realização de um procedimento analítico de acordo com os princípios modernos de química analítica verde.

Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica inovadora para a determinação de agrotóxicos envolvendo RDSE baseada em um dispositivo impresso em 3D.

Objetivos Específicos

- Sintetizar a filamentos para impressão 3D baseados em sílica modificada;
- Confeccionar dispositivos de RDSE a base de sílica e filamentos comerciais mediante impressão 3D para serem empregados como fase extratora alternativa para a extração de agrotóxicos em águas superficiais;
 - Otimizar de forma multivariada as condições de extração (tempo, pH, velocidade de agitação, força iônica) e dessorção (tipo e volume de solvente, tempo e temperatura) da técnica de RDSE;
- Validar o método proposto para a determinação de agrotóxicos em águas superficiais utilizando RDSE;
- Aplicar o método desenvolvido para a determinação de agrotóxicos em amostras reais de água coletadas em diferentes regiões.

Metodologia Proposta

Na etapa de síntese das fases extratoras serão utilizados os seguintes reagentes da marca Sigma-Aldrich: Pluronic P123, ortossilicato de tetraetila (TEOS), ácido clorídrico 37%, etanol anidro, 3-aminopropiltriethoxissilano, metil-trimethoxissilano e fenil-trimethoxissilano. Todos os reagentes apresentam pureza de 95% ou maior.

Nas etapas de desenvolvimento do método analítico e validação serão utilizados padrões analíticos de contaminantes ambientais da marca Sigma-Aldrich (99% de pureza) de agrotóxicos organoclorados contendo α -1,2,3,4,5,6-Hexaclorociclohexane; β -BHC; lindano; δ -BHC; 1,1-Dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano; 4,4'-DDE; 4,4'-DDT; Dieldrin; α -Endosulfan; β -Endosulfan; Endrin; Endrin aldeído; Heptacloro; Heptacloro epóxido e

Metoxicloro. Adicionalmente, agrotóxicos organofosforados incluindo Azinfos-metil; Clorpirifós; Diclorvós; Disulfoton; Etoprofós; Metil Paration; Protiofós; Diazinon; Malation; Etion; Metamidofós; Pirazofós; Ometoato. Acefato.. Também serão utilizados os solventes orgânicos acetonitrila e metanol grau LC-MS da marca Merck e água purificada em sistema Milli-Q® (com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C), marca Millipore.

Síntese e caracterização das fases extratoras

Primeiramente será realizada a síntese das fases extratoras a base de sílica, na Central Analítica da UFCSPA, através da hidrólise ácida do TEOS com um modificador de estrutura, o surfactante Pluronic P123, conforme estabelecido na literatura [25]. Após, será feita a funcionalização da sílica com grupos funcionais organossilanos tais como 3-aminopropiltrietoxissilano, metil-trimetoxissilano e fenil-trimetoxissilano, a fim de favorecer a interação da fase sólida com os analitos que serão posteriormente extraídos das amostras aquosas. Além da utilização dos filamentos produzidos em laboratório, também serão testados filamentos comerciais já prontos para a impressão dos dispositivos.

Com o intuito de obter informações relacionadas à estrutura e morfologia das fases extratoras sintetizadas, serão realizadas análises para caracterização das mesmas, sendo estas: microscopia eletrônica de varredura (MEV), Análise Termogravimétrica TGA e Espectrofotometria no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

A seguir estão descritos os equipamentos que serão utilizados neste projeto. A parte experimental do projeto será realizada no laboratório multiusuário da Central Analítica da UFCSPA, somente algumas caracterizações serão feitas em parceria com o Laboratório de Sólidos e Superfícies da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os equipamentos abaixo descritos encontram disponíveis na UFCSPA para a realização deste projeto de pesquisa

- Impressora 3D FDM, modelagem por fusão e deposição, marca Creality, modelo HT-5 (Instrumento previamente adquirido pelo proponente com recursos vinculados à Chamada Universal CNPq/MCTI/FNDCT N° 18/2021).
- Espectrofotômetro Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), modelo IR PRESTIGE21 marca SHIMADZU;
- Sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), marca SHIMADZU.

Além disso, mediante parceria com o Laboratório de Sólidos e Superfícies da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), serão ainda utilizados os seguintes instrumentos:

- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)
- Equipamento para Análise Termogravimétrica (TGA)
- Extrusora de filamento, marca Filmaq 3D

Após a síntese e caracterização, serão confeccionados filamentos para impressão 3D com as fases extratoras preparadas.

Elaboração do dispositivo

Para a confecção do dispositivo RDSE, inicialmente será elaborado um modelo tridimensional do microdispositivo por meio do sistema CAD utilizando o software gráfico livre FreeCad®. Após, as fases extratoras a base de sílica sintetizadas anteriormente passarão por uma extrusora, com a finalidade de formarem filamentos sólidos próprios para serem utilizados na impressora 3D e, em seguida, os dispositivos serão impressos pelo método de Modelagem por Fusão e Deposição (FDM). A plataforma de impressão será mantida a uma temperatura menor (115°C) que a do bico de extrusão (220°C) de forma que a primeira camada depositada endureça e seja possível a deposição da camada seguinte, garantindo que o objeto permaneça fixo na mesa de impressão. Ao dispositivo cilíndrico impresso será acoplado uma barra magnética para que a agitação da amostra seja realizada de forma automática em chapa de agitação.

Otimização do procedimento de extração

Após a produção do dispositivo, será realizada uma etapa de otimização da etapa de preparo de amostra na qual serão utilizadas amostras de água ultrapura fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos estudados e submetidas ao procedimento de extração proposto. Os parâmetros que podem influenciar a extração por RSDE serão avaliados através de técnicas quimiométricas de planejamento experimental multivariado tais como planejamento fatorial, planejamento composto central e planejamento utilizando matriz Doehlert. Essas estratégias de otimização serão realizadas com auxílio do *Software Statistica 8.0*. Visto que os analitos são estáveis termicamente, estes serão analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

Validação do método analítico e análise de amostras reais

A validação é um procedimento adotado para verificar se a metodologia desenvolvida é adequada para analisar o que se pretende. Sendo assim, após a otimização de todas as variáveis significativas da etapa de preparo de amostras, as metodologias propostas serão validadas de acordo com guias de validação vigentes e recomendações, avaliando-se parâmetros de mérito como linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, seletividade, efeito memória e robustez.

Os métodos desenvolvidos para a determinação dos contaminantes emergentes serão aplicados em amostras de águas superficiais coletadas em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul mediante colaborações com outras instituições de ensino superior. Estas amostras serão estocadas em frascos de vidro propriamente selados e mantidas sob refrigeração a 4°C até a análise.

Etapas de execução do projeto com respectivo cronograma de atividades

As etapas envolvidas na realização deste projeto estão dispostas na **Tabela 1** juntamente com o cronograma para a realização em 12 meses (divididos em trimestres).

Tabela 1. Cronograma de execução das atividades elencadas no projeto.

<i>Etapas</i>

	Trimestre			
	1º	2º	3º	4º
Revisão de literatura	X	X	X	X
Síntese e caracterização das fases extratoras	X	X		
Produção dos filamentos por extrusão		X		
Confecção dos dispositivos de RDSE para extração em impressora 3D		X	X	
Otimização do preparo de amostras por RDSE para a determinação de agrotóxicos em água			X	
Validação do método para determinação de agrotóxicos em água e análise de amostras			X	X
Redação de artigo para publicação				X
Elaboração de relatório final				X

O levantamento bibliográfico será realizado durante todo o período, enfatizando-se as publicações mais recentes. Adequações e modificações poderão ser realizadas levando-se em consideração a execução em 12 meses a partir do recebimento dos insumos necessários para a execução do projeto.

Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Novas fases extratoras são uma alternativa promissora para contornar problemas apresentados pelas fases comerciais comumente empregadas em técnicas de extração e microextração. Acredita-se que as fases extratoras sintetizadas neste trabalho serão bastante seletivas para os analitos estudados e irão apresentar alta capacidade de extração, possibilitando a obtenção de baixos LODs e LOQs, além de satisfatória estabilidade química frente aos solventes orgânicos empregados.

Além disso, a metodologia proposta será totalmente otimizada e permitirá alcançar vantagens em relação aos métodos descritos na literatura para a determinação dos contaminantes ambientais estudados em amostras de águas superficiais, incluindo o uso de menores volumes de amostra, baixos volumes de solventes, tempo de extração reduzido e menor geração de resíduos. Estas características garantem que esta proposta se enquadra no desenvolvimento de métodos ambientalmente corretos e eficientes para análises ambientais. Desta forma, contribui com alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) preconizados atualmente para enfrentar desafios complexos.

Entre os ODS que este projeto de pesquisa está relacionado, podem ser destacados:

- 3 – Saúde e bem-estar;
- 4 – Educação de qualidade;
- 9 – Indústria, inovação e infraestrutura;
- 14 – Vida na água.

A confecção do dispositivo utilizando impressão 3D para a posterior aplicação na técnica por RDSE representa uma grande inovação, podendo resultar em importante publicação na área de preparo de amostras, uma vez que aumentará consideravelmente a superfície de contato entre o analito e a fase extratora quando comparado aos dispositivos de RDSE tradicionais, proporcionando extrações mais eficientes.

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

Os resultados obtidos com a execução dessa proposta apresentam potencial para publicação em periódicos nacionais e/ou internacionais especializados na área, tendo em vista as características inovadoras dos dispositivos de extração a serem produzidos. Desta forma, os produtos gerados apresentam em sua essência caráter técnico-científico inovador.

Adicionalmente, nos dias atuais, busca-se o desenvolvimento de metodologias analíticas sustentáveis que corroborem com os princípios da Química Verde, com uso reduzido de solventes e segurança do analista. Cabe também ressaltar que o custo de implementação é muito inferior aos custos dos métodos baseados em SPE tradicionalmente empregados para determinação de agrotóxicos em amostras aquosas.

Além disso, o projeto envolverá a participação alunos de mestrado e doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biociências que são orientados pelo proponente. Desta forma, também consiste em uma ferramenta para a formação de recursos humanos qualificados a nível de pós-graduação na UFCSPA.

Referências bibliográficas

1. Sodré FF, Pescara IC, Montagner CC, Jardim WF. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem J* [Internet]. 2010;96(1):92–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.012>
2. Petrovic M, Barceló D. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants. *Anal Bioanal Chem*. 2006;385(3):422–4.
3. Branco NMC, Albert ALM, Romão CMCPA. Poluentes emergentes: Antimicrobianos no ambiente, a educação ambiental e o aspecto regulatório nacional e internacional. *Res Soc Dev*. 2021;10(8):e16910817083.
4. Branco FOL, Cárdenas SMM, Serrão ICG, Cunha IRV da, Amado LL, Kütter VT. Contaminantes Emergentes nas Bacias Hidrográficas Brasileiras e seus potenciais efeitos a espécies ameaçadas de extinção. *Rev Bras Meio Ambient*. 2021;9(2):140–74.
5. NORMAN. Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances [Internet]. [cited 2021 Sep 19]. Available from: <http://www.norman-network.net/?q=node/19>
6. Quadra GR, Oliveira de Souza H, Costa R dos S, Fernandez MA dos S. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2017;24(2):1200–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7789-4>
7. Montagner CC, Vidal C, Acayaba RD. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim Nova*. 2017;40(9):1094–110.
8. Primel EG, Caldas SS, Marube LC, Escarrone ALV. An overview of advances in dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. *Trends Environ Anal Chem* [Internet]. 2017;14:1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.teac.2017.03.001>

9. Carasek E, Merib J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2015;880:8–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>
10. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2018;102:123–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>
11. Martins RO, de Araújo GL, de Freitas CS, Silva AR, Simas RC, Vaz BG, et al. Miniaturized sample preparation techniques and ambient mass spectrometry as approaches for food residue analysis. *J Chromatogr A* [Internet]. 2021;1640:461949. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461949>
12. Carasek E, Morés L, Merib J. Basic principles, recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. *Trends Environ Anal Chem* [Internet]. 2018;19:e00060. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2018.e00060>
13. Fumes BH, Silva MR, Andrade FN, Nazario CED, Lanças FM. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2015;71:9–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.011>
14. Augusto F, Carasek E, Silva RGC, Rivellino SR, Batista AD, Martendal E. New sorbents for extraction and microextraction techniques. *J Chromatogr A* [Internet]. 2010;1217(16):2533–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.033>
15. Cañas A, Valdebenito S, Richter P. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma Microextraction Techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(8):2205–10.
16. Richter P, Leiva C, Choque C, Giordano A, Sepúlveda B. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *J Chromatogr A*. 2009;1216(49):8598–602.
17. Li F, Ceballos MR, Balavandy SK, Fan J, Khataei MM, Yamini Y, et al. 3D Printing in analytical sample preparation. *J Sep Sci*. 2020;43(9–10):1854–66.
18. Duarte LC, De Carvalho TC, Lobo-Júnior EO, Abdelnur P V., Vaz BG, Coltro WKT. 3D printing of microfluidic devices for paper-assisted direct spray ionization mass spectrometry. *Anal Methods*. 2016;8(3):496–503.
19. Hoque ME, Chuan YL, Pashby I. Extrusion based rapid prototyping technique: An advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers*. 2012;97(2):83–93.
20. Macdonald NP, Currivan SA, Tedone L, Paull B. Direct Production of Microstructured Surfaces for Planar Chromatography Using 3D Printing. *Anal Chem*. 2017;89(4):2457–63.
21. Cecil F, Guijt RM, Henderson AD, Macka M, Breadmore MC. One step multi-material 3D printing for the fabrication of a photometric detector flow cell. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2020;1097:127–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.075>
22. Rusling JF. Developing Microfluidic Sensing Devices Using 3D Printing. *ACS Sensors*. 2018;3(3):522–6.
23. Su CK, Peng PJ, Sun YC. Fully 3D-Printed Preconcentrator for Selective Extraction of Trace Elements in Seawater. *Anal Chem*. 2015;87(13):6945–50.

24. Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal Chem.* 2014;86(7):3240–53.
25. Da Silveira T, Awano CM, Donatti DA, De Vicente FS, Vollet DR. About the thermal stability and pore elimination in the ordered hexagonal mesoporous silica SBA-15. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2014;190:227–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.02.023>

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



Priscila da Trindade Flores

**Estudo do perfil alimentar e imunológico
de atletas soropositivos para SARS-CoV-2**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2022

Priscila da Trindade Flores

Estudo do perfil alimentar e imunológico de atletas soropositivos para SARS-CoV-2

Projeto de tese submetido ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Doutor

Orientadora: Dr^a Alessandra Peres

**Porto Alegre
2022**

DADOS PESSOAIS DOS PESQUISADORES

Coordenadora geral do estudo: Profª Dra. Alessandra Peres

Local de trabalho: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA - Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170.

Telefone: (51) 999619331 E-mail: aleimuno@hotmail.com

Pesquisadora: Priscila da Trindade Flores

Doutoranda: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Telefone: (55) 991344971 E-mail: prisciladatrindeflores@gmail.com

Vigência: setembro/2021 a setembro/2025

Agenda 2030:

ODS 3: Saúde e bem-estar

ODS 12: Consumo e produção responsáveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO E EXERCÍCIO FÍSICO	10
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SARS-COV-2	12
1.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CORRIDA	13
2. PROBLEMA DE PESQUISA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. HIPOTÉSES	15
5. JUSTIFICATIVA	16
6. METODOLOGIA	17
6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	17
6.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	17
6.3 CÁLCULO AMOSTRAL	17
6.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
6.4.1 Critérios de Inclusão	18
6.4.2 Critérios de Exclusão	18
6.5 INSTRUMENTO DE PESQUISA	18
6.5.1 Ficha de Anamnese	18
6.5.2 Avaliação Antropométrica	19
6.5.3 Avaliação do Consumo Alimentar	19
6.5.4 Coletas Sanguínea e Análises Bioquímicas	20
6.5.4.1 Imunoensaios enzimáticos	20
6.5.4.2 Imunofenotipagem	21
6.5.4.3 Ensaios de citotoxicidade e degranulação de células nk	21
6.5.4.4 Avaliação do conteúdo mitocondrial e do estado de polarização mitocondrial	22
6.5.4.5 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio em células nk e linfócitos T	22
6.5.4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (rmn de 1h)	22
6.5.4.7 Cultura celular com as linhas mcf-7, pc-3 e pnt1a	23
6.5.4.8 Ensaio cometa	23
6.5.5 CONTROLE DE CARGA E INTENSIDADE DE TREINAMENTO	24
6.5.6 QUALIDADE DE VIDA	24
6.5.7 COLETA SALIVAR	24
6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6.7 RISCOS E BENEFÍCIOS	25
6.8 CONDUTA ÉTICA	25

6.9 DESCARTE DE RESÍDUOS.....	26
6.10 CRONOGRAMA	26
7. ORÇAMENTO	28
8. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS	30
9. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	31
ANEXO A - QUESTIONÁRIO DE RASTREAMENTO METABÓLICO	34
ANEXO B- QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)	36
ANEXO C - QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA (<i>SHORT-FORM HEALTH SURVEY</i> (SF-36)	44
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	43
APÊNDICE B - ENTREVISTA ESTRUTURADA E FICHA DE AVALIAÇÃO	47
APÊNDICE C - REGISTRO ALIMENTAR – INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO	49
APÊNDICE D – REGISTRO DE ATIVIDADES FÍSICAS DIÁRIAS	52

RESUMO

A pandemia da COVID-19 provoca alterações temporárias e permanentes na saúde dos indivíduos infectados pelo Sars-CoV-2. A preocupação relacionada aos atletas refere-se à segurança para a realização da atividade física sem que ocorram riscos de novas infecções, principalmente virais. Compreender através da comparação entre atletas soropositivos para Sars-CoV-2 com atletas soronegativos o impacto no fenótipo de células imunes, perfil de citocinas sistêmico, bem como função de células imunológicas. A amostra do estudo será de atletas e indivíduos não atletas, que testaram positivo e negativo para COVID-19, maiores de 18 até 40 anos. As coletas serão realizadas em intervalos regulares de 3 meses após a entrada no estudo por um período de 12 meses. Serão realizadas anamnese com dados sociodemográficos e de saúde, rastreamento metabólico, qualidade de vida, avaliação antropométrica e consumo alimentar. Haverá avaliação dos volumes e intensidades de exercícios físicos dos atletas investigados; presença de anticorpos no plasma de atletas soropositivos ou negativos para SARS-CoV-2 através da titulação de anticorpos IgG e IgM para o nucleocapsídeo e proteína Spike; quantificação das concentrações circulantes de IgA, cortisol, testosterona, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10; imunofenotipagem de células T CD4+, CD8+, células NK quanto a marcadores de imunoregulação, exaustão e memória imunológica; avaliação da atividade citotóxica de células PBMC em ensaios de citotoxicidade e degranulação; verificação do perfil metabólico sistêmico e ainda será realizada a cultura celular com suplementação do plasma para verificar o comportamento das linhagens MCF-7, PC-3 e PNT1A, ensaio cometa e coleta salivar. Este projeto apresenta grande potencial na geração de estudos científicos que possam contribuir de forma significativa para a compreensão do comportamento imunológico em atletas que desenvolveram resposta para Sars-CoV-2. A partir destes dados, aprimorar o acompanhamento de alterações inflamatórias induzidas pelo exercício além de avaliar o impacto da infecção por Sars-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; metabolismo; inflamação; treinamento físico

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic causes temporary and permanent changes in the health of individuals infected with Sars-CoV-2. The concern related to athletes refers to the safety to perform physical activity without the risk of new infections, especially viral. To understand by comparing Sars-CoV-2 seropositive athletes with seronegative athletes the impact on immune cell phenotype, systemic cytokine profile, as well as immune cell function. The study sample will consist of athletes and non-athletes who tested positive and negative for COVID-19, over 18 to 40 years. Collections will be performed at regular 3-month intervals after entry into the study for a period of 12 months. Anamnesis will be carried out with sociodemographic and health data, metabolic tracking, quality of life, anthropometric and food consumption assessment. There will be an evaluation of the volumes and intensities of physical exercises of the investigated athletes; presence of antibodies in the plasma of seropositive or negative for SARS-CoV-2 through the titration of IgG and IgM antibodies to nucleocapsid and Spike protein; quantification of circulating concentrations of IgA, cortisol, testosterone, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10; immunophenotyping of CD4+, CD8+ T cells, NK cells for markers of immunoregulation, exhaustion and immune memory; evaluation of the cytotoxic activity of PBMC cells in cytotoxicity and degranulation assays; verification of the systemic metabolomic profile and cell culture will be performed with plasma supplementation to verify the behavior of the MCF-7, PC-3 and PNT1A strains, comet assay and salivary collection. This project has great potential in generating scientific studies that can significantly contribute to the understanding of immunological behavior in athletes who developed a response to Sars-CoV-2. From these data, to improve the monitoring of inflammatory changes induced by exercise in addition to evaluating the impact of Sars-CoV-2 infection.

Keywords: COVID-19; Metabolism; Inflammation; Physical training

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: agência nacional de vigilância sanitária

ANOVA: análise de variância AP

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IID - Índice de Inflamação da Dieta

IgA: imunoglobulina A

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

IFN- γ : interterferon gama

MCP1: proteína quimiotática de monócitos 1

NK: células natural Killers

PCR : proteína C reativa

QV: qualidade de vida

SPSS: software de estatística

TC: termo de confidencialidade

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β : fator de crescimento beta

TLR: receptores toll-like

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde

VEGF: fator de crescimento de vasos endoteliais

RESUMO LEIGO

O projeto visa verificar os efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica de atletas, compreender se há correlação entre volume de treinamento físico e propensão a infecções e verificar um possível impacto da COVID-19 no sistema imunológico dos atletas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO E EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico é considerado um dos principais componentes de uma vida saudável. Além das funções relacionadas à prevenção do excesso de peso corporal, inflamação sistêmica e doenças crônicas não transmissíveis, sugere-se um potencial benéfico do exercício físico na redução de doenças transmissíveis, incluindo patologias virais¹.

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 imune².

A ativação da resposta imune pode resultar na liberação de fatores pró (interleucina 1 (IL1), interleucina 8 (IL8), TNF alfa (TNF- α), fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF)) e anti-inflamatórios (interleucina 4 (IL4), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL13)). A prática de exercício físico constante favorece a permanência de um status anti-inflamatórios nos indivíduos o que tem sido fortemente debatido como uma excelente alternativa não farmacológica para o tratamento de doenças crônicas como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares³.

Além dos fatores solúveis são observadas alterações celulares como por exemplo nas células T reguladoras CD4+, CD25+, CD127-, FoxP3+ as quais regulam respostas inflamatórias através da secreção de IL-10 e TGF- β . Estas células são estimuladas através da realização de exercício e sua ação se estende a monócitos, células dendríticas, células T CD4 e CD8 assim como as células Natural Killers (NK)⁴.

A atividade física tem um impacto positivo no peso, pressão arterial e glicose, dislipidemia, desejo por cigarro, ansiedade, depressão e inflamação sistêmica. Além disso, também promove melhora a resposta imunológica às vacinas e diminui a duração e a gravidade da doença viral, principalmente por meio do aumento dos níveis de citocinas antiinflamatórias (por exemplo, IL-10, antagonista do receptor de

interleucina-1) e através da regulação negativa da expressão/ativação de receptores toll-like (TLRs)⁵.

Tem sido demonstrada a relação do exercício com a melhora de pacientes acometidos por câncer e mesmo na prevenção para o desenvolvimento da doença^{6,7}. A realização de uma sessão de treino é capaz de mobilizar leucócitos com melhora na capacidade funcional destas células. Existem teorias de que o exercício é capaz de melhorar a resposta dos pacientes a imunoterapia incluindo inibidores de checkpoints⁸.

Porém a hipótese da “janela-aberta” sugere que a prática de exercício físico extenuante aumenta o risco de infecções do trato respiratório superior. Esta prática está relacionada com diferentes intensidades e volumes de treino sobre os sistemas². Essa teoria significa que há uma “janela aberta” de imunidade alterada (que pode durar entre 3 e 72 horas) na qual o risco de infecção clínica após o exercício é excessivo⁹. Nesse caso, doses moderadas poderiam ser benéficas para a resposta imunológica quando praticadas a longo prazo, porém a prática extenuante poderia causar um desequilíbrio na homeostasia imunológica proporcionando a suscetibilidade para infecções².

O exercício pode induzir também alterações hormonais, como níveis aumentados de cortisol. Essas mudanças são descritas como mediadoras da imunossupressão após a sessão de treinamento¹⁰. Esse impacto do exercício é associado à ocorrência de infecções das vias aéreas superiores¹¹. Doenças respiratórias podem ter um impacto negativo na saúde e no desempenho de atletas que realizam altos níveis de exercícios extenuantes. A doença respiratória superior é o motivo mais comum de apresentações lesões não relacionadas à medicina esportiva, respondendo por 35-65% das apresentações de doenças¹².

Outro ponto determinante para integridade do sistema imunológico é a nutrição, estudos que mostram que a nutrição inadequada ou inapropriada, para tais características específicas do treinamento e do atleta, pode agravar o esforço consequentemente a resposta imunológica. Uma ingestão adequada de micronutrientes, aminoácidos, macronutrientes e fitoterápicos específicos são importantes para a manutenção da função imune, em contrapartida a ingestão excessiva de alguns micronutrientes podem causar toxicidade ao organismo o que

levaria a efeitos adversos sobre a saúde e até mesmo a alteração da adaptação da resposta ao treinamento¹³.

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SARS-COV-2

A pandemia da COVID-19 provoca alterações temporárias e permanentes na saúde dos indivíduos infectados pelo Sars-CoV-2. Acredita-se que grande parte da doença crítica associada à infecção por SARS-CoV-2 seja o resultado de um processo hiperinflamatório conhecido como hipercitocinemias ou uma “tempestade de citocinas”¹⁴.

A tempestade de citocinas é uma resposta hiperinflamatória aguda que pode ser responsável por doenças críticas em muitas condições, incluindo infecções virais, câncer, sepse e falência de múltiplos órgãos. A tempestade de citocinas provoca aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, e IFN- γ e baixos níveis de citocinas relacionados ao padrão anti-inflamatório como a IL-4 são observados nos pacientes. Também parece existir uma relação da gravidade do paciente com maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias¹⁵.

O fenômeno foi implicado em pacientes gravemente enfermos infectados com SARS-CoV-2. Acredita-se que os pacientes com COVID-19 criticamente enfermos com tempestade de citocinas tenham um pior prognóstico e aumento da taxa de letalidade. Em pacientes infectados com SARS-CoV-2, a tempestade de citocinas parece importante para a patogênese de várias manifestações graves de COVID-19: síndrome do desconforto respiratório agudo, doenças tromboembólicas, como acidente vascular cerebral isquêmico agudo causado por oclusão de grandes vasos e infarto do miocárdio, encefalite, rim agudo prejuízo, e vasculite (síndrome do tipo Kawasaki em crianças e vasculite renal em adultos¹⁴.

O exercício físico tem efeitos antiinflamatórios importantes para atenuar não apenas a inflamação, mas também a inflamação sistêmica geral, observada em populações fisicamente inativas e obesas. As citocinas liberadas pela contração dos músculos esqueléticos (“miocinas”) tem efeitos antiinflamatórios locais e pleiotrópicos, imunorreguladores e de promoção da saúde. IL-7 e IL-15, que são fatores proliferativos de linfócitos, são liberados durante o exercício, apoiando a

função e a proliferação de células imunes, principalmente células T virgens. A IL-15 também é essencial para manter as células T CD8+ de memória e a ativação, produção e citotoxicidade das células NK, tornando-se um fator importante na estimulação das respostas imunológicas às infecções¹⁶.

A preocupação relacionada aos atletas refere-se à segurança para a realização da atividade física sem que ocorram riscos de novas infecções, principalmente virais. Ainda não está bem claro o tempo necessário para que ocorra a recuperação do desequilíbrio imunológico provocado pelo vírus. Até o momento atletas que tiveram contato com o vírus reportam sintomas residuais por várias semanas e meses tais como tosse, fadiga extrema bem como taquicardia¹⁷.

O controle da produção de estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS), que produzem dano celular, é modulado pela prática de atividade física por dois mecanismos, a inibição do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a estimulação das vias do fator nuclear eritroide 2 (Nrf2). O exercício pode ativar as vias de sinalização antiinflamatórias que podem ser relevantes na atenuação dos sintomas da COVID-19. O treinamento físico pode melhorar rotas alternativas de produção de óxido nítrico (ON), estimulação da expressão endotelial do óxido nítrico endotelial (eNOS), modulação do estresse oxidativo com efeitos antivirais e recuperação pulmonar pós-infecção de COVID-19. A implementação de atividade física é uma ferramenta complementar útil para a prevenção, aumentando a recuperação, melhorando a qualidade de vida e fornecendo proteção imunológica no longo prazo¹⁸.

1.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CORRIDA

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 adeptos¹⁹. 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 adeptos²⁰.

Os exercícios aeróbicos melhoram a função do sistema imunológico, aumentando o nível e a função dos linfócitos T, neutrófilos, macrófagos e monócitos, que são elementos essenciais na defesa do corpo contra infecções, aumentando os níveis de imunoglobulinas “IgA, IgM, IgG”, particularmente IgA e IgG por causa de seu papel vital nas infecções pulmonares, regulando os níveis de proteína C reativa, através da produção de um pequeno aumento de curto prazo para combater os vírus pulmonares e uma diminuição de longo prazo para prevenir qualquer queda nas funções pulmonares e diminuir a ansiedade e depressão para melhorar a imunidade por meio do reequilíbrio da relação T-helper 1 / T-helper 2²¹.

Estudos indicam que exercícios aeróbicos de intensidade moderada diminuam a gravidade e a progressão dos distúrbios associados ao COVID-19 e melhora da qualidade de vida. Além disso, duas semanas de exercícios aeróbicos produziram um efeito positivo no sistema imunológico, aumentando as quantidades de leucócitos, linfócitos, imunoglobulina. Essa prática pode ajudar clinicamente a melhorar as funções imunológicas, o que pode levar a uma diminuição no custo da hospitalização. Além disso, ajuda a aumentar a eficácia das vacinas COVID-19, devido ao aumento das funções imunológicas. O exercício físico ajuda a diminuir o sofrimento de pacientes com COVID-19, diminuindo seus distúrbios associados e taxas de mortalidade²².

O padrão de resposta imunológica desencadeada por COVID-19 grave permanece notavelmente distinto das alterações imunológicas induzidas por outras infecções virais ou uma tempestade de citocinas²³. 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 a infecções de mucosas e sistema respiratório bem como na qualidade de vida. 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.

2 PROBLEMA DE PESQUISA

Qual o impacto da infecção por Sars-CoV-2 no perfil inflamatório de atletas?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender através da comparação entre atletas soropositivos para Sars-CoV-2 com atletas soronegativos o impacto no fenótipo de células imunes, perfil de citocinas sistêmico, bem como função de células imunológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença anticorpos para SARS Cov-2
- Conhecer o impacto no fenótipo e atividades celulares de linfócitos T e células NK
- Avaliar a capacidade de produção de citocinas por PBMC in vitro,
- Avaliar o consumo alimentar através do Índice de Inflamação da Dieta (IID)
- Avaliar a composição corporal dos atletas,
- Avaliar a qualidade de vida dos atletas
- Verificar a relação do perfil alimentar e de suplementação, bem como da intensidade do exercício com os índices inflamatórios dos atletas e composição corporal.
- Avaliar a relação do perfil imunológico ao IID em atletas com diagnóstico soropositivo para sars-cov-2,
- Avaliar a relação do dano ao DNA e IID em atletas com diagnóstico soropositivo para sars-cov-2,
- Avaliar a relação da qualidade de vida ao perfil inflamatório e IID em atletas.

4 HIPÓTESES

A hipótese da “janela-aberta” sugere que a prática de exercício físico extenuante aumenta o risco de infecções do trato respiratório superior². A pandemia da COVID-19 provoca uma tempestade de citocinas são observadas nos pacientes. Também parece existir uma relação da gravidade do sujeito com maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias¹⁵. A preocupação relacionada aos atletas

refere-se à segurança para a realização da atividade física sem que ocorram riscos de novas infecções, principalmente virais.

5 JUSTIFICATIVA

Este estudo visa compreender os efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica desses indivíduos, bem como compreender se há correlação entre volume de treinamento físico e propensão a infecções de mucosas e sistema respiratório bem como na qualidade de vida. 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.

6 METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Projeto de pesquisa classificado em estudo observacional que utilizará amostras sanguíneas, aplicação de questionários e dados clínicos pertencentes a população de estudo.

6.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Para a realização do estudo, serão recrutados atletas (nível competitivo nacional e internacional) e indivíduos não atletas, que testaram positivo ou negativo para COVID-19, maiores de 18 até 40 anos, que aceitem fazer parte do estudo, deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os participantes serão recrutados através de contato com assessorias esportivas, cartaz digital e carta à universidade. Participarão todos aqueles que entregarem o TCLE (APÊNDICE A) e se enquadrarem nos critérios de inclusão.

6.3 CÁLCULO AMOSTRAL

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 cortisol²⁴, 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 88 participantes.

6.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os participantes serão divididos em 4 grupos de 21 atletas cada:

- 1) Atletas soropositivo para SARS-CoV-2,
- 2) Atletas soronegativo para SARS-CoV-2,
- 3) sujeitos não atletas soropositivos para SARS-CoV-2 e
- 4) sujeitos não atletas soronegativos para SARS-CoV-2.

As coletas serão realizadas em intervalos regulares de 3 meses após a entrada no estudo por um período de 12 meses.

6.4.1 Critérios de Inclusão:

- Ter idade superior a 18 anos e inferior a 50 anos;
- Concordar e assinar o TCLE
- Alfabetizadas
- Praticar exercício físico de forma contínua a mais de 6 meses
- Praticar exercício físico pelo menos 150 minutos semanal;
- Corredores de longa distância (10 Km ou mais)

6.4.2 Critérios de Exclusão:

- Ter realizado procedimento cirúrgico nos últimos seis meses;
- Ter menos de 18 anos;
- IMC ≥ 25
- Gravidez;
- Fumar;
- Doença inflamatória aguda e/ou presença de infecção;
- Doença gengival ou periodontal;
- Fazer uso de anti-inflamatório no momento do estudo;
- Ter tido qualquer tipo de lesão na última semana pré coleta.

6.5 INSTRUMENTOS DE PESQUISA

6.5.1 Ficha de anamnese

A ficha para coleta de dados (APÊNDICE B) será preenchida pelo próprio pesquisador, durante entrevista com o avaliado antes da antropometria. A anamnese será composta por dados de identificação, socioeconômicos e de saúde do avaliado. E na sequência será realizado o questionário de rastreamento metabólico (ANEXO A)

6.5.2 Avaliação antropométrica

Na coleta de dados antropométricos serão utilizados os seguintes equipamentos: balança científica com estadiômetro acoplado da marca Filizola®, com capacidade de 150Kg e precisão de 100g para aferição de peso e estatura, para coleta das pregas cutâneas adipômetro científico da marca Cescorf® com sensibilidade 0,1mm e amplitude de leitura 88mm. Para a avaliação antropométrica serão utilizados os dados de peso corporal (kg), estatura (m).

Para avaliação da composição corporal dos homens será utilizado o somatório de sete dobras cutâneas ($\Sigma 7DC$) (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdominal + coxa medial), através da equação preditiva de densidade corporal e porcentagem de gordura para homens atletas de 18 a 61 anos de Jackson e Pollock (1978)²⁵: Densidade corporal (DC) (g/cm^3) = $1,112 - 0,00043499$ (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdome + coxa medial) + $0,0000055$ (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdome + coxa medial)² - $0,00028826$ (idade). E para as mulheres Jackson, Pollock e Ward (1980)²⁶ Densidade corporal (DC) (g/cm^3) = $1,097 - 0,00046971$ (torácica + axilar média + tríceps + subescapular + supra ilíaca + abdome + coxa medial)² - $0,00012828$ (idade em anos). O percentual de gordura será calculado utilizando-se a equação de Siri (1961)²⁷, representada pela seguinte fórmula: % Gordura = $[(4,95/DC) - 4,50] \times 100$.

6.5.3 Avaliação do consumo alimentar

Para avaliar a ingestão dietética quantitativamente será utilizado o registro alimentar de três dias não consecutivos (APÊNDICE B), sendo um deles final de semana. No registro alimentar o indivíduo deve anotar todos os alimentos ingeridos e suplementos utilizados com sua respectiva quantidade em medidas caseiras ou gramagem. As medidas caseiras serão convertidas em gramas segundo manual de Fisberg e Villar (2002)²⁸. O registro será calculado através do software Diet Win®. Será aplicado o Questionário de frequência alimentar para população brasileira (QFA)²⁹(ANEXO B). O cálculo do Índice de Inflamação da Dieta (IID) será calculado,

conforme descrito por Shivappa et al (2014)³⁰, para cada indivíduo, a partir da soma dos escores de cada componente alimentar e nutriente específico.

6.5.4 Coletas sanguínea e análises bioquímicas

Serão coletadas amostras sanguíneas dos participantes dos estudos. Os participantes estarão na posição sentada e as amostras serão coletadas individualmente por pessoas capacitadas. As coletas sanguíneas serão realizadas em intervalos regulares de 3 meses após a entrada no estudo por um período de 12 meses. As coletas serão realizadas na sala de coleta do Laboratório de Análises Clínicas da UFCSPA. Todo o procedimento será realizado obedecendo às normas de biossegurança para material biológico.

Serão coletados 20mL de sangue venoso através de punção na veia antecubital dos participantes em tubos sem anticoagulante (4mL) ou tubos contendo EDTA (16 mL). Os tubos sem anticoagulantes serão centrifugados por 10 minutos em uma rotação de 4000 rpm para obtenção do soro, ao qual será aliqotado e congelado a -20°C para posteriores análises. Os tubos com anticoagulantes serão centrifugados por 10 minutos em uma rotação de 4000 rpm para obtenção do plasma, ao qual será aliqotado e congelado a -20°C para posteriores análises.

O sangue coletado em tubos contendo EDTA será utilizado para obtenção de células mononucleares periféricas através do gradiente de concentração utilizando-se Ficoll Histopaque 1077 conforme descrito por Bicalho et al (1981)³¹. A viabilidade celular deverá ser >98% determinada pela contagem em câmara de Neubauer com azul trypan e o volume celular será ajustado de acordo com as necessidades para imunofenotipagem (1×10^7 células/mL) e estimulação celular para secreção de citocinas (1.5×10^5 células/mL).

6.5.4.1 Imunoensaios enzimáticos

Para observar o estado inflamatório dos participantes, a concentração plasmática de IgA, cortisol, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10 serão medidos pelo método

LUMINEX obtido na Pensabio®, Brasil, de acordo com as instruções do fabricante. Anticorpos IgA e IgG para o nucleocapsídeo e a proteína Spike do SARS-CoV-2 serão titulados por ensaios de ELISA.

6.5.4.2 Imunofenotipagem

Serão marcadas com anticorpos monoclonais, onde 1×10^6 células/mL, com diferentes fluorocromos CD3+, CD4+, CD8, CD16, CD56, CD25, CD127, HLA-DR, CD27, CD28, CD57, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG3, KLRG1 em um procedimento de marcação de seis cores associados a fluorocromos específicos. A expressão intracelular de NF- κ B será avaliada em células T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+. Apoptose será avaliação através de Anexina-V-PI. Os dados de imunofenotipagem serão adquiridos utilizando CELLquest Pro Software (BD Bioscience, San Jose, USA) em um citômetro de fluxo FACSCanto II.

6.5.4.3 Ensaios de citotoxicidade e degranulação de células NK

As células serão cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, a 37 ° C com 5% de CO₂. Em seguida, PBMC serão co-cultivados com células-alvo K562 e incubadas por 4h a 37°C, as células serão lavadas e coradas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD56 para quantificar o número de células NK. Após uma lavagem final, iodeto de propídio (PI) será adicionado e os números de células NK. A citotoxicidade das células NK será quantificada como a porcentagem de lise específica (% lise total - % morte celular espontânea). A avaliação da expressão intracelular de granzima e perforina nos subconjuntos de células NK CD56dim e CD56bright será realizada. Os fenótipos das células NK expressando CD107a (para desgranulação) e IFN- γ serão resolvidos por citometria de fluxo. Monensina, anti-CD107a e brefeldina A serão adicionados a cada poço. Após uma incubação de 4 horas, as células serão colhidas da placa e pipetadas para tubos FACS. As células serão lavadas e ressuspensas em PBS. As células em cada tubo são então coradas com anti - CD56, anti - CD3 e anti - NKG2C. Além disso, as células são então lisadas, permeabilizadas e coradas com anti - IFN - γ e analisadas por citometria de fluxo.

6.5.4.4 Avaliação do conteúdo mitocondrial e do estado de polarização mitocondrial

As células obtidas do sangue periférico dos atletas serão incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 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.

6.5.4.5 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio em células NK e linfócitos T

Serão avaliadas através do reagente MitoSox™ (por citometria de fluxo com excitação/emissão em 510/580).

6.5.4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H)

Será realizada em espectrômetro de 600 MHz, Varian Inova, equipado com uma sonda tripla de frio. Um total de 256 varreduras será coletado, com um tempo de aquisição de 4 segundos e intervalos de retardo de relaxamento entre as varreduras de 1,5 s. Após a aquisição de todo o espectro, o ajuste de fase, correção da linha de base, calibração espectral e quantificação serão realizados pelo software Chenomx NMR Suite 7.6. Serão realizadas análises estatísticas multivariadas para análise dos dados espectrais, como análise de componentes principais (PCA), e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Será realizada a análise dos dados no software MetaboAnalyst 3.0.

O PCA será aplicado para examinar a diferenciação no perfil metabólico geral entre as mudanças durante o tempo de acompanhamento dos atletas. Em seguida, o PLS-DA será conduzido para classificar a segregação do grupo e identificar os metabólitos mais importantes para explicar as mudanças no perfil metabólico entre os grupos. Metabólitos com importância variável para projeção (VIP) maior > 1,0 serão classificados como os metabólitos mais importantes na segregação do modelo.

Modelos PLS-DA reduzidos serão testados, com esses metabólitos, até que seja obtido um modelo com maior capacidade preditiva utilizando o menor número possível de variáveis. A robustez e qualidade dos modelos serão relatadas por testes de permutação (cem permutações) e validação cruzada (R^2Y e Q^2).

6.5.4.7 Cultura celular com as linhas MCF-7, PC-3 e PNT1A

Estas células serão cultivadas a 37°C com 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 suplementado com kanamicina 0,5 mg/mL e 10% de soro bovino fetal (SBF). O plasma coletado dos atletas será utilizado na suplementação das culturas e as análises serão realizadas no sobrenadante das culturas.

6.5.4.8 Ensaio Cometa

O ensaio cometa será realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000). O sangue será coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados. As células do sangue (alíquotas de 5 µL) serão embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 115 µL) e a mistura será adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas serão cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas serão incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, será realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 30v e 300mA por 35 minutos. Todas estas etapas serão realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas serão neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA será corado Syber Gold (Invitrogen, EUA) para posterior análise. Um total de 100 células por indivíduo (50 células por duplicata) serão analisadas usando o sistema de análise de

imagem semi-automatizado Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). As análises microscópicas serão realizadas em um microscópio de fluorescência (Eclipse E400, Nikon Instruments, Japão), com objetiva de 40X. A porcentagem de DNA na cauda do cometa (% TDNA) será o parâmetro usado para avaliar o dano do DNA.

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Serão utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas serão codificadas para análise às cegas.

6.5.5 CONTROLE DE CARGA E INTENSIDADE DE TREINAMENTO

Será realizado um diário que será disponibilizado para que cada sujeito indique características das sessões diárias de treinamento ((APÊNDICE C). Desta forma, anotações quanto ao volume de exercício (em forma de quilômetros percorridos em cada sessão), intensidade (através do percentual da frequência cardíaca máxima), frequência semanal de treinos e percepção subjetiva de esforço com base na Escala de Borg³².

6.5.6 QUALIDADE DE VIDA

A qualidade de vida será avaliada por meio do questionário *Short-Form Health Survey* (SF-36), traduzido e validado no Brasil³⁵. Este, contém 36 itens divididos em oito perfis que detectam o estado de saúde do paciente, subdivididos em componentes de saúde física (capacidade funcional, aspectos físicos, dor e estado geral de saúde) e mental (vitalidade, aspectos sociais, aspecto emocional e saúde mental). As pontuações foram ponderadas individualmente para cada domínio e combinados das médias de componente de saúde física e componente de saúde mental. A pontuação é feita através de em uma escala de 0 a 100, e quanto maior o escore, melhor a percepção da qualidade de vida

6.5.7 COLETA SALIVAR

Serão coletadas amostras de saliva (ELISA Development Kit, 900-M21, Peprotech Inc, USA), nos períodos pré e pós corrida.

6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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.

6.7 RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos da participação na pesquisa são considerados de leves a moderados. Os leves devido a constrangimento para responder aos questionamentos ou cansaço devido à extensão dos instrumentos. Os riscos médios referem-se à coleta de sangue, que pode causar dor, desconforto, formação de hematomas e/ou outras lesões no local da coleta e, em alguns casos, pode haver ocorrência de desmaio. Em ambos os casos, os participantes serão atendidos e tratado por um profissional capacitado para a resolução do problema no próprio local, para estabelecer o seu bem estar físico. E em caso de qualquer efeito adverso, comprovadamente decorrente da presente pesquisa, será indenizado.

Com a participação na pesquisa terá como benefícios os resultados das avaliações realizadas além da orientação a respeito de todas as avaliações: alimentar, composição corporal, perfil inflamatório. O conhecimento destes determinantes pode auxiliar no planejamento dos treinos e melhora da performance.

6.8 CONDUTA ÉTICA

O projeto de pesquisa atende a Resolução 466/12, e estará sobre apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). A participação no estudo será voluntária, podendo o indivíduo solicitar, a qualquer momento, sua retirada/saída do estudo. Nenhum indivíduo terá custos para participar, bem como não irá receber remuneração para tal. A identidade dos indivíduos não será divulgada, de forma alguma, havendo sigilo nas informações fornecidas conforme as normas de ética em pesquisa

O Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado na UFCSPA coordenado pela professora orientadora do projeto bem como laboratórios de uso compartilhado na UFCSPA estão equipados com a estrutura necessária para realização dos experimentos propostos. Parte dos reagentes já foram adquiridos com verbas como PROAP e editais internos da Universidade. Os proponentes também irão participar de editais de fomento durante o período da realização do projeto.

6.9 DESCARTE DE RESÍDUOS

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

6.10 CRONOGRAMA

Quadro 1 – Cronograma das atividades a serem realizadas no período de setembro de 2021 a setembro de 2025.

Atividades	2021/ 2	2022/ 1	2022/ 2	2023/ 1	2023/ 2	2024/ 1	2024/ 2	2025/ 1
Revisão de literatura	X	X	X					
Elaboração do projeto	X	X						

Encaminhamento para CEPE e comitê de ética			X					
Coleta dos dados			X	X	X	X		
Relatório parcial do projeto de pesquisa				X				
Análise e interpretação dos dados						X	X	
Relatório parcial do projeto de pesquisa						X		
Redação do relatório final de pesquisa							X	X
Entrega e apresentação do artigo								X

7 ORÇAMENTO

O orçamento da presente pesquisa será de responsabilidade dos pesquisadores e dos recursos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA. Sendo que parte do material para a realização da pesquisa, encontra-se armazenado no laboratório, sob responsabilidade da professora Alessandra Peres.

Na Tabela 1 estão discriminados os materiais necessários para o desenvolvimento do projeto já existentes no laboratório. Na tabela 2 a discriminação dos materiais a serem adquiridos.

Tabela 1 - Discriminação dos materiais a serem utilizados do projeto já existentes.

Item	Quantidade
Leitor Espectrofotômetro	1
Citômetro de Fluxo	1
IgA, cortisol, IL-1 β , IFN- α , IFN γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10	1 kit para 100 análises de cada
Capela fluxo laminar	3
Estufa CO ₂	1
Microscópio invertido	1
Linhagens celulares MCF-7, PC-3 e PNT1A	1 vial de cada linhagem
Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	1
Marcadores imunofenotipagem CD3+, CD4+, CD56, CD25, CD127, HLA-DR, CD27, CD28, CD57, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG3, KLRG1	1ml para 100 testes de cada marcador

Tabela 2 - Discriminação dos materiais a serem utilizados do projeto a serem adquiridos.

Item	Quantidade	Preço Unitário (R\$)	Custo (R\$)
Anti-Human CD8a APC	1 kit para 100 testes	1.060,00	1.060,00
Anti-Human CD14 PE	1 kit para 100 testes	1.823,00	1.823,00
Anti-Human CD16 FITC	1 kit para 100 testes	2.374,00	2.374,00
Anti-Human CD279 (PD-1) PE	1 kit para 100 testes	2.628,00	2.628,00
Anti-Human CD163 PE-Cyanine7	1 kit para 100 testes	3.137,00	3.137,00
Anti-Human CD45RA APC	1 kit para 100 testes	1.472,02	1.472,02
Anti-Human CD3 APC	1 kit para 100 testes	1.409,61	1.409,61
Transporte deslocamento dos participantes	200 passagens municipais	960,00	960,00
Total			14.863,63

8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Este projeto apresenta grande potencial na geração de estudos científicos que possam contribuir de forma significativa para a compreensão do potencial imunorregulador em atletas por infecção por Sars-Cov-2 que possa influenciar no acompanhamento de alterações inflamatórias induzidas pelo exercício. Além disso o uso do plasma dos atletas na suplementação das culturas tumorais permitirá melhor compreensão dos efeitos do exercício físico de atletas infectados pelo vírus no crescimento de células tumorais.

Desta forma pretende-se contribuir para o entendimento da resposta do sistema imune dos atletas para a prevenção, manutenção e recuperação durante o treinamento, proporcionando um benefício pleno na realização do exercício. Auxiliando na aplicação de estratégias não farmacológicas para a manutenção da qualidade de vida destes indivíduos.

9 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

1. Laddu DR, Lavie CJ, Phillips SA, Arena, R. Physical activity for immunity protection: Inoculating populations with healthy living medicine in preparation for the next pandemic. *Progr Cardiovasc Dis.* 2021;64(102).
2. Simpson RJ, Campbell JP, Gleeson M, Krüger K, Nieman DC, Pyne DB, et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection?. *Exerc Immunol Rev.* 2020;26:8-22.
3. Scheffer DDL, Latini A. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(10)
4. Dorneles GP, Dos passos AAZ, Romão PRT, Peres A. New Insights about Regulatory T Cells Distribution and Function with Exercise: The Role of Immunometabolism. *Curr Pharm Des.* 2020;26(9):979-90.
5. Zbinden-Foncea H, Francaux M, Deldicque L, Hawley JA. Does high cardiorespiratory fitness confer some protection against pro-inflammatory responses after infection by SARS-CoV-2?. *Obesity.* 2020;28:1378–81.
6. Idorn M, Thor SP. Exercise and cancer: from "healthy" to "therapeutic"? *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(5):667-671.
7. Stout NL, Baima J, Swisher AK, Winters-Stone KM, Welsh J. A Systematic Review of Exercise Systematic Reviews in the Cancer Literature (2005-2017). *PM&R.* 2017: S347-S384.
8. Gustafson MP, Wheatley-Guy CM, Rosenthal AC, Gastineau DA, Katsanis E. et al. Exercise and the immune system: taking steps to improve responses to cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2021;9(7).
9. Chamorro VC, Del-Valle MF, Tacón AM. Excessive exercise and immunity: The J-shaped curve. *The Active Female.* 2014:357-72.
10. Gonçalves CAM, Dantas PMS, Dos Santos IK, Dantas M, da Silva DCP, Cabral BGD. et al. Effect of acute and chronic aerobic exercise on immunological markers: a systematic review. *Front Physiol.* 2020;(10): 1602.
11. Nieman DC. Upper respiratory tract infections and exercise. *Thorax.* 1995;50(12): 1229-31.
12. Gleeson M, Pyne DB. Respiratory inflammation and infections in high-performance athletes. *Cell Immunol.* 2016;94(2):124-31.
13. Cauwenberghs N, Prunicki M., Sabovčik F, Perelman D, Contrepois K, Li X. et al. Temporal changes in soluble angiotensin-converting enzyme 2 associated with

metabolic health, body composition, and proteome dynamics during a weight loss diet intervention: a randomized trial with implications for the COVID-19 pandemic. *Am J Clin Nutr.* 2021;114(5):1655-65.

14. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, Mittoo S, Weissert R, Kass JS. et al. Cytokine storm in COVID-19—immunopathological mechanisms, clinical considerations, and therapeutic approaches: the REPROGRAM consortium position paper. *Front Immunol.* 2021;11:1648.

15. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93(1):250-6.

16. Jakobsson J, Cotgreave I, Furberg M, Arnberg N, Svensson, M. Potential physiological and cellular mechanisms of exercise that decrease the risk of severe complications and mortality following sars-cov-2 infection. *Sports.* 2021;9(9):121.

17. Wilson MG, Hull JH, Rogers J, Pollock N, Dodd M, Haines J. et al. Cardiorespiratory considerations for return-to-play in elite athletes after COVID-19 infection: a practical guide for sport and exercise medicine physicians. *BMJ.* 2020;54(19): 1157-61.

18. Fernández-Lázaro D, González-Bernal JJ, Sánchez-Serrano N, Navascués LJ, Ascaso-del-Río A, Mielgo-Ayuso J. Physical Exercise as a Multimodal Tool for COVID-19: Could It Be Used as a Preventive Strategy?. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(22): 8496.

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

20. Hino AAF, Reis RS, RODRIGUEZ-AÑEZ R, FERMINO RC. Prevalência de lesões em corredores de rua e fatores associados. *Rev bras ciênc esporte.* 2009;15(1):36-9.

21. Mohamed AA, Alawna M. Role of increasing the aerobic capacity on improving the function of immune and respiratory systems in patients with coronavirus (COVID-19): A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(4):489-496.

22. Mohamed AA, Alawna M. The effect of aerobic exercise on immune biomarkers and symptoms severity and progression in patients with COVID-19: A randomized control trial. *J Bodyw Mov Ther.* 2021;28:425-32.

23. Notz Q, Schmalzing M, Wedekink F., Schlesinger T, Gernert M, Herrmann J. et al. Pro-and anti-inflammatory responses in severe COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome—an observational pilot study. *Front Immunol.* 2020;11.

24. McDowell SL, Hughes RA, Hughes RJ, Housh TJ, Johnson GO. The Effect of Exercise Training on Salivary Immunoglobulin A and Cortisol Responses to Maximal Exercise. *Sports Med Int.* 1992;13(08): 577-80.

25. Jackson AS, Pollock M. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr.* 1978;497-504.
26. Jackson AS, Pollock ML, Ward ANN. Generalized equations for predicting body density of women. *Med Sci Sports Exerc.* 1980;12(3):175-81.
27. Siri WE. "Body composition from fluids spaces and density: Analysis of two methods." *Techniques for Measuring Body Composition.* 1961:223-4.
28. Fisberg RM, Villar BS. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus, 2002.
29. Crispim SP, Ribeiro RDCL, Panato E, Silva MMSD, Rosado LEFP, Rosado GP. Validade relativa de um questionário de frequência alimentar para utilização em adultos. *Rev Nut.* 2009;22:81-95.
30. Shivappa N, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR, Hébert JR. Projetar e desenvolver um índice inflamatório alimentar baseado na população, derivado da literatura. *Nutrição em saúde pública.* 2014;17 (8):1689-96.
31. Bicalho HM, Gontijo CM, Nogueira-Machado JA. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *J Immunol Methods.* 1981;40(1):115-16.
32. Borg GAV. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc.* 1982;14:377-81
33. Ciconelli RM. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev Bras Reumatol.* 1999;39:143-150.

ANEXO A - QUESTIONÁRIO DE RASTREAMENTO METABÓLICO

Nome: _____

Sexo: () Masculino () Feminino Data: _____

Avalie cada sintoma seu baseado em seu perfil de saúde típica no seguinte período:

*últimos 30 dias

*última semana

*últimas 48 horas

Escala de Pontos

- 0** – Nunca ou quase nunca teve o sintoma
1 – Ocasionalmente teve, efeito não foi severo
2 – Ocasionalmente teve, efeito foi severo
3 – Frequentemente teve, efeito não foi severo
4 – Frequentemente teve, efeito foi severo

		TOTAL
CABEÇA	• Dor de cabeça • Sensação de desmaio • Tonturas • Insônia	
OLHOS	• Lacrimejantes ou coçando • Inchados, vermelhos, ou com os cílios colando • Bolsas ou olheiras abaixo dos olhos • Visão borrada ou em túnel (não inclui miopia ou astigmatismo)	
OUVIDOS	• Coceiras • Dores de ouvido, infecções auditivas • Retirada de fluido purulento do ouvido • Zunido e perda da audição	
NARIZ	• Entupido • Problemas de Seios Nasais (Sinusite) • Corrimento nasal, espirros, lacrimejamento e coceira dos olhos (todos juntos)	
BOCA/GARGANTA	• Tosse crônica • Frequente necessidade de limpar a garganta • Dor de garganta, rouquidão ou perda da voz • Língua, gengivas ou lábios inchados / descoloridos • Aftas	
PELE	• Acne • Feridas que coçam, erupções ou pele seca • Perda de cabelo • Vermelhidão, calorões • Suor excessivo	
CORAÇÃO	• Batidas irregulares ou falhando • Batidas rápidas demais • Dor no peito	

Avalie cada sintoma seu baseado em seu perfil de saúde típica no seguinte período:

*últimos 30 dias

*última semana

*últimas 48 horas

Escala de Pontos

- 0** – Nunca ou quase nunca teve o sintoma
1 – Ocasionalmente teve, efeito não foi severo
2 – Ocasionalmente teve, efeito foi severo
3 – Frequentemente teve, efeito não foi severo
4 – Frequentemente teve, efeito foi severo

		TOTAL
PULMÕES	• Congestão no peito • Asma, bronquite • Pouco fôlego • Dificuldade para respirar	
TRATO DIGESTIVO	• Náuseas, vômito • Diarreia • Constipação / prisão de ventre • Sente-se inchado / com abdômen distendido • Arrotos e/ou gases intestinais • Azia • Dor estomacal / intestinal	
ARTICULAÇÕES/ MÚSCULOS	• Dores articulares • Artrite / artrose • Rigidez ou limitação dos movimentos • Dores musculares • Sensação de fraqueza ou cansaço	
ENERGIA/ ATIVIDADE	• Fadiga, moleza • Apatia, letargia • Hiperatividade • Dificuldade em descansar, relaxar	
MENTE	• Memória ruim • Confusão mental, compreensão ruim • Concentração ruim • Fraca coordenação motora • Dificuldade em tomar decisões • Fala com repetições de sons ou palavras, com várias pausas involuntárias • Pronuncia palavras indistinta, confusa • Problemas de aprendizagem	
EMOÇÕES	• Mudanças de humor, Mau humor matinal • Ansiedade, medo e nervosismo • Raiva, irritabilidade, agressividade • Depressão	
OUTROS	• Frequentemente doente • Frequente ou urgente vontade de urinar • Coceira genital ou corrimento • Edema / Inchaço – Pés / Pernas / Mãos	
	Total de Pontos	

“Com a permissão de The Institute for Functional Medicine - www.Functionalmedicine.org”

Todos os direitos reservados ao Centro Brasileiro de Nutrição Funcional.

[illegible][illegible]

CEREAIS/LEGUMINOSAS

[illegible]

HORTALIÇAS E FRUTAS

[illegible]

SOBREMESAS E DOCES

[illegible]

PRODUTOS DIET E LIGHT

[illegible]

ANEXO C - QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA (SHORT-FORM HEALTH SURVEY (SF-36))

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes	Definitivamente falso

				falso	
a) Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do estudo: Estudo do perfil alimentar e imunológico de atletas soropositivos para SARS-CoV-2

Pesquisadora: Priscila da Trindade Flores

Pesquisadora responsável: Prof.^a Dra. Alessandra Peres

Instituição: UFCSPA

Local da análise de dados: Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Telefone para contato: (55) 991344971

E-mail para contato: prisciladatrindeflores@gmail.com

Você está sendo convidado(a) a participar da coleta de dados desta pesquisa de forma totalmente voluntária e sem custos. Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de decidir participar. A participação neste estudo é voluntária e livre, podendo ser cancelada em qualquer fase do processo. Não haverá compensação financeira para os participantes relacionada à sua participação. Ao participar do estudo você receberá uma via deste termo.

Com a participação neste estudo você contribuirá para a compreensão dos efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica de atletas, bem como compreender se há correlação entre volume de treinamento físico e propensão a infecções de mucosas e sistema respiratório bem como na qualidade de vida. Considerando a pandemia da COVID-19, pretendemos verificar um possível impacto da COVID-19 no sistema imunológico dos atletas.

A coleta de dados para este estudo constará em responder uma ficha de anamnese com informações gerais e de saúde e questionário de rastreamento metabólico e qualidade de vida. Para avaliar a ingestão alimentar, você preencherá um registro alimentar de três dias e questionário de frequência alimentar (QFA). As orientações quanto ao preenchimento serão realizadas por acadêmico(a) treinado(a), com o objetivo de obter informações que permitam definir e quantificar a alimentação consumida, no período de referência, sem indução de respostas. Será necessário realizar o registro diário do treino.

Para avaliar seu perfil inflamatório, serão colhidas amostras de sangue, na sala de coleta do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, localizado no segundo andar do prédio II da universidade, por um profissional habilitado. Para colheita de sangue serão necessários em torno de 10 minutos. Nenhuma amostra de sangue será armazenada. O descarte será realizado em sacos brancos e a agulha será descartada imediatamente após o procedimento em recipientes apropriados para materiais perfuro cortantes. Todo o procedimento será realizado obedecendo às normas de biossegurança para material biológico. Também será medido seu peso, altura e dobras cutâneas nos dias das avaliações.

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.

Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, e você poderá desistir após ter concordado em participar do estudo em qualquer momento, sem que haja nenhuma responsabilidade ou qualquer prejuízo. Informamos que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Com a participação na pesquisa terá como benefício os resultados das avaliações realizadas além da orientação a respeito de todas as avaliações; alimentar, composição corporal, perfil inflamatório.

Os riscos da participação na pesquisa são considerados de leves a moderados. Os leves devido a constrangimento para responder aos questionamentos ou cansaço devido à extensão dos instrumentos. Os riscos médios referem-se à coleta de sangue, que pode causar dor, desconforto, formação de hematomas e/ou outras lesões no local da coleta e, em alguns casos, pode haver ocorrência de desmaio. Caso ocorra, você será atendido e tratado por um profissional capacitado para a resolução do problema no próprio local, para estabelecer o seu bem-estar físico. E em caso de qualquer efeito adverso, comprovadamente decorrente da presente pesquisa, você será indenizado

Os dados levantados serão confidenciais, resguardando a identidade dos sujeitos, e poderão ser utilizados para estudos e publicações científicas, por 5 anos,

mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade. Ficando sob responsabilidade dos pesquisadores para futuros estudos, desde que seja respeitada totalmente sua privacidade e confidencialidade. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados obtidos e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Assim, ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto,

Eu _____, portador (a) da carteira de identidade número _____, afirmo que, após a leitura deste documento e de esclarecimentos dados pelos pesquisadores, concordo com a realização desta pesquisa e autorizo minha participação, como também autorizo a publicação em meio acadêmico dos dados, informações e outros procedimentos coletados nesta pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento conforme minha necessidade. Considero-me igualmente informado: sobre os procedimentos nos quais estarei envolvido, dos riscos e benefícios esperados.
Assinatura: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 2021.

Caso você tenha dúvidas ou solicite esclarecimentos, entrar em contato com o pesquisador responsável professora Alessandra Peres email: peres@ufcspa.edu.br e telefone: (51)99619331, ou com a autora Priscila da Trindade Flores email: prisciladatrindadeflores@gmail.com e telefone (55)991344971, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA pelo telefone (51)3303-8804.

Observação: O presente documento baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (resolução 466/12), será assinado em suas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do paciente ou de seu representante legal e outra com o pesquisador responsável.

APÊNDICE B - ENTREVISTA ESTRUTURADA E FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome:	Data de Nascimento:
Raça:	Profissão:
Escolaridade:	Estado civil:
Tabagista: () Sim () Não.	Horas média de sono:
Medicamentos de uso contínuo (dose/frequência)	
Uso de anti-inflamatório nos últimos 15 dias? () Sim () Não.	
Uso de álcool: () Sim () Não. Consumo: () diário; () semanal; () eventual. Se sim, qual a quantidade em copos:	
Doenças associadas?	Cirurgia nos últimos 6 meses?
Hábito intestinal: () normal () constipado(a) .	
Frequência de evacuações: () diária () a cada 2 dias () a cada 3 dias () _____	
Consumo de água você toma ao dia: _____ copos	

Atividade física	
Modalidades esportivas:	Frequência semanal:
Há quanto tempo pratica?	Duração média do treino em horas:
Faz acompanhamento com assessoria esportiva? () Sim () Não.	

Teve COVID-19 ? () Sim () Não.	Apresentou sintomas () Sim () Não.
Quais?	
Precisou de internação? () Sim () Não.	
Foi vacinado para COVID-19? () Sim () Não	Detalhar esquema vacinal (tipos/datas):

Faz acompanhamento nutricional com nutricionista? () Sim () Não.	
Usa suplementos nutricionais?	Quem orientou? () Nutricionista () Outros
Nome comercial:	Quantidade?
Frequência diária:	Frequência semanal:
Uso de esteroides anabolizantes?	Quantidade?
Tempo de uso? Frequência?	

Avaliação antropométrica			
Peso (kg)			
Altura (cm)			
Tríceps (mm)			
Torácica(mm)			
Abdome (mm)			
Axilar média (mm)			
Subescapular (mm)			
Suprailíaca (mm)			
Coxa medial (mm)			

Densidade corporal: _____

Massa Magra _____ kg _____ %

Massa Gorda _____ kg _____ %

APÊNDICE C - REGISTRO ALIMENTAR – INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO

- O diário alimentar deve ser preenchido pelo próprio atleta em três dias, sendo um no final de semana.
- Faça descrições de alimentos e bebidas como, por exemplo, tipo de pão (trigo, integral, etc.) ou tipo de leite (integral, desnatado, semidesnatado).
- Para anotar as quantidades, usar medidas como “colher de sopa” (rasa, média ou cheia), “colher de sobremesa”, “colher de chá”, “colher de café” . Exemplo: arroz cozido– 3 colheres de sopa rasas.
- Anotar o modo de preparo dos alimentos (frito, cozido, assada, à milanesa).
- No caso de ingerir alimentos cujo preparo seja mais sofisticado, referir no “modo de preparo” os ingredientes utilizados (receita). Exemplo: Lasanha: (frango, massa de lasanha, molho branco, cebola, tomate, queijo).
- Sempre referir o nome comercial dos produtos e a quantidade ingerida. Exemplo: Uma lata de refrigerante “guaraná light” 350 ml.
- Para anotar as quantidades, usar medidas como “colher de sopa” (rasa, média ou cheia), “colher de sobremesa”, “colher de chá”, “colher de café”. Exemplo: arroz cozido – 3 colheres de sopa rasas.
- Para as saladas, favor especificar as verduras e legumes que compõem a mesma, e dizer se estão crus ou cozidos. Referir o tempero utilizado, bem como a quantidade.
- Anotar se nas bebidas como café, chá e sucos foi usado açúcar ou adoçante, bem como a quantidade dos mesmos.

- Bebidas comerciais isotônicas devem ser referidas, bem como uso de outros complementos nutricionais com os devidos horários e quantidades.

- Bebidas alcóolicas devem ser incluídas, bem como suas quantidades.

* No caso de haver dúvidas quanto ao preenchimento, por favor anotar no diário para consulta posterior ao pesquisador.

Atenção:

Lembramos que as informações alimentares deverão ser as mais precisas possíveis, pois estas serão utilizadas para cálculos posteriores, de acordo com as informações fornecidas nestes três registros.

NOTA: Se tiver balança ou conhecer o peso do alimento pode referi-lo

Obrigada,

Priscila Flores

91344971

REGISTRO ALIMENTAR

Data _____ Dia da semana: _____ () com treino () sem treino

Nome _____

Horário	Alimentos sólidos e líquidos	Forma de preparo	Quantidade em medidas caseiras

APÊNDICE D – REGISTRO DE ATIVIDADES FÍSICAS DIÁRIAS

DIA DO MÊS	TIPO DE EXERCÍCIO	VOLUME	INTENSIDADE (FC máx)	PSE
		Corrida: KM percorridos Outras atividades: tempo		
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				
15.				
16.				
17.				
18.				
19.				
20.				
21.				
22.				
23.				
24.				
25.				
26.				
27.				
28.				
29.				
30.				
31.				

6	Sem nenhum esforço
7	
	Extremamente leve
8	
9	Muito leve
10	
11	Leve
12	
13	Um pouco intenso
14	
15	Intenso (pesado)
16	
17	Muito intenso
18	
19	Extremamente intenso
20	Máximo esforço

Figura 1. Escala RPE (*rating of perceived exertion*) de Borg



**INFLUÊNCIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE
ALZHEIMER E O POSSÍVEL EFEITO PROTETOR DAS CHALCONAS**

PROJETO DE DOUTORADO APRESENTADO AO PPG BIOCÊNCIAS

Vanessa Krüger Engers

Orientação: Dra. Karine Rigon Zimmer

Coorientação: Dra. Aline Rigon Zimmer

Porto Alegre

2023

INFLUÊNCIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER E O POSSÍVEL EFEITO PROTETOR DAS CHALCONAS

Aluna: Vanessa Krüger Engers

Orientadora: Dra. Karine Rigon Zimmer

Coorientadora: Dra. Aline Rigon Zimmer (UFRGS)

Vigência: março/2023 a fevereiro/2027

Fontes de financiamento:

CNPq - Processo nº424260/2018-2

FAPERGS – PqG nº 60604.674.18606.26112021

ODs a que se vincula:



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 RESPALDO CIENTÍFICO.....	8
1.1.1 Modelo Experimental – <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>).....	8
1.1.2 Doença De Alzheimer.....	10
1.1.3 Infecções e Doença de Alzheimer.....	12
1.1.4 Chalconas.....	17
2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.1 Grupo Infecção (GI):.....	21
3.2 Grupo Tratamento Pré-Infecção (GTPré):.....	22
3.3 Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós):.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 MATERIAIS.....	24
4.1.1 Cepas bacterianas e de <i>C. elegans</i>	24
4.1.2 Compostos Naturais: Chalconas.....	24
4.2 MÉTODOS.....	24
4.2.1 Grupo Controle.....	24
4.2.2 Exposição aguda e crônica aos patógenos bacterianos – Grupo Infecção (GI).....	25
4.2.3 Tratamento com compostos chalconoides PRÉ exposição aos patógenos- Grupo Tratamento Pré-Infecção (GTPré).....	25
4.2.4 Tratamento com compostos chalconoides APÓS exposição aos patógenos- Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós).....	25
4.2.5 Sincronização.....	26
4.2.6 Ensaios.....	26
5. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.....	32
6. CRONOGRAMA.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

ABREVIATURAS

A β = β - amiloide;

C. elegans = *Caenorhabditis elegans*;

DA = Doença de Alzheimer;

GABA = Ácido gama-aminobutírico;

GI = Grupo Infecção;

GTPré = Grupo Tratamento Pré-Infecção;

GTPós = Grupo Tratamento Pós-Infecção;

HSV-1 = Herpes simplex tipo 1;

LPS = Lipopolisacarídeos;

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*;

PPbA = Proteína Precursora de β - amiloide;

S. aureus = *Staphylococcus aureus*;

SNC = Sistema Nervoso Central;

WHO = *World Health Organization*.

RESUMO

Estima-se que cerca de 50 milhões de indivíduos no mundo sofram de demência, sendo a Doença de Alzheimer (DA) a de maior prevalência. Pesquisas têm mostrado que infecções bacterianas influenciam o cérebro através da capacidade de produzir e modificar fatores metabólicos, imunológicos e neuroquímicos. De fato, diferentes microrganismos já foram detectados no fluido cérebro-espinhal e cérebros pós-morte de pacientes com DA. Além disso, se faz urgente a busca por novas estratégias de neuroproteção. As chalconas são precursores diretos na biossíntese de flavonoides, conhecidos pelas propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Estudos recentes mostram efeitos positivos destes compostos em vias relacionadas ao aprendizado e memória, bem como efeito neuroprotetor, tornando-se potenciais agentes terapêuticos na DA. Tendo em vista a dificuldade de estudos envolvendo humanos, altos custos e questões éticas relacionadas a projetos com animais vertebrados, o nematoide *Caenorhabditis elegans* vem sendo considerado um ótimo organismo modelo para avaliar infecções bacterianas, neurodegeneração e testagem de potenciais fármacos, devido a características como hermafroditismo, curto período de vida, corpo totalmente transparente, simplicidade do sistema nervoso e grande similaridade com sistemas humanos, com destaque para a homologia de genes entre as espécies. Neste estudo, utilizaremos cepas selvagens e transgênicas de *C. elegans* que expressam o peptídeo β -amiloide, a fim de simular a DA, e cepas ATCC de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, para as infecções. Serão realizados ensaios de sobrevivência, paralisia, atividade de acetilcolinesterase, quimiotaxia, postura de ovos, avaliação dos agregados $A\beta$, integridade dos circuitos neuronais e análise proteômica. Com isso, o objetivo deste trabalho é verificar se a exposição a patógenos bacterianos de ampla relevância clínica podem levar ao desenvolvimento de sinais e sintomas da DA, evidenciando uma possível associação entre estes eventos patológicos. Além disso, testaremos as chalconas como possíveis tratamentos alternativos, com o intuito de colaborar para a evolução das estratégias farmacológicas nas doenças neurodegenerativas.

Palavras- chave: Doença de Alzheimer; Infecção; Bactérias; Chalconas; *C. elegans*.

ABSTRACT

It is estimated that about 50 million people suffer from dementia worldwide, and Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia. Previous research has shown that bacterial infections influence the brain through their ability to produce and modify metabolic, immune, and neurochemical factors. In fact, different microorganisms have already been detected in cerebrospinal fluid and post-mortem brains of AD patients. In addition, a new neuroprotection approach becomes urgent. Chalcones are direct biosynthesis precursors of flavonoids, known for their anti-inflammatory and antioxidant properties. Recent studies show positive outcomes of chalcones on learning and memory, besides neuroprotective effect, emerging as a potential therapeutic agent in AD. *Caenorhabditis elegans* is a nematode considered a suitable model organism for bacterial infections, neurodegeneration and potential drug tests, because of features like hermaphroditism, short lifespan and simple nervous system. Studies reveal that genes associated with neurodegenerative diseases in humans have homologs in *C. elegans*. Thereby, the objective of this work is evaluate whether exposure to clinically relevant bacterial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* can lead to development of AD, and verify the effects of natural compounds such as chalcones on the progression of AD, using the invertebrate *C. elegans* as a model. For this purpose, we will use wild-type and transgenic strains of *C. elegans* that express β -amyloid peptide in order to simulate AD. This project aims to assess whether there is an association between bacterial infections and AD, and also understand the mechanisms underlie this process. Additionally, we aim to discover alternative therapies based on natural compounds, intended to contribute to the breakthrough of pharmacological strategies in neurodegenerative diseases.

Keywords: Alzheimer's disease; Infection; Bacteria; Chalcones; *C. elegans*.

RESUMO LEIGO

Neste projeto iremos testar em laboratório, se as infecções causadas por bactérias são capazes de provocar a Doença de Alzheimer, bem como avaliar se alguns compostos naturais, chamados chalconas, podem ser utilizados como possíveis candidatos a medicamentos para o tratamento da doença de Alzheimer. Realizaremos estes testes em um verme microscópico chamado *C. elegans*. Ele é encontrado no solo, se alimenta de bactérias, tem o corpo transparente e vem contribuindo muito para o avanço da ciência na área das doenças neurodegenerativas por possuir muitas semelhanças com os seres humanos.

1. INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas podem causar a Doença de Alzheimer (DA)? Chalconas possuem potencial terapêutico neste cenário? Com base nestas perguntas, este projeto de pesquisa pretende compreender de que maneira as infecções bacterianas estão envolvidas nos mecanismos que permeiam o desenvolvimento e a progressão da Doença de Alzheimer (DA), bem como, encontrar estratégias farmacológicas para tratamento e prevenção da doença, através da utilização de compostos naturais (chalconas). Utilizaremos para isso, o nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo experimental.

Segundo a *World Health Organization* (WHO, 2021), a DA é a doença neurodegenerativa de maior incidência mundial, afetando cerca de 45 milhões de pessoas no mundo atualmente, com 7,7 milhões de novos casos a cada ano, o que nos leva a uma estimativa de 78 milhões de casos até 2030 e 139 milhões de casos até 2050. Em 2019, o custo global das demências foi estimado em cerca de US\$1.3 trilhão e a projeção para 2030 é de cerca de US\$2.8 trilhões anuais. Os impactos dessas enfermidades, levando em consideração o aumento previsto da prevalência nas próximas décadas, representam enormes desafios sociais e econômicos, fazendo-se urgente a busca por estratégias inovadoras para definir novos alvos farmacológicos e fatores modificadores da doença.

Apesar dos numerosos estudos, o entendimento da etiologia, patofisiologia e tratamento da DA ainda são bastante limitados devido a sua complexidade e multiplicidade de fatores envolvidos (Long & Holtzman, 2019). Há cerca de 30 anos, as infecções microbianas vêm sendo associadas à patogênese e à patofisiologia da DA e outras doenças neurodegenerativas. Esta hipótese propõe que patógenos, como vírus, bactérias, príons e outros, são um fator de risco relevante para o desenvolvimento da DA, porém seus mecanismos permanecem pouco compreendidos (Seaks & Wilcock, 2020). Diversos grupos de pesquisa vêm levantando inúmeras evidências que corroboram com a ideia, mas para comprovar a hipótese, é necessário compreender uma série de aspectos referentes aos microrganismos, seus mecanismos de atuação no hospedeiro, esclarecer as ligações moleculares específicas entre os eventos patológicos, e assim, reconhecer qual o real impacto destas interações nos processos neurodegenerativos (Barichello et al., 2022). As chalconas possuem propriedades biológicas conhecidas, contudo estudos relacionando a

ação destas no sistema nervoso central (SNC) ainda são recentes e não abrangem todo o potencial destes compostos (Mathew et al., 2019).

Baseado nisso, fica evidente a relevância deste projeto, que visa investigar se bactérias patogênicas de grande relevância clínica como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* estão envolvidas no desenvolvimento da neurodegeneração e/ou de sinais da DA, bem como sugerir novas possibilidades de prevenção e tratamento. Essas avaliações serão realizadas em um modelo experimental simples, o nematoide *C. elegans*, o qual já é bem estudado em sua estrutura e fisiologia, contempla a necessidade de utilização de modelos alternativos ao uso de vertebrados, permite a visualização dos sistemas neuronais *in vivo*, e possui grande variedade de cepas mutantes para estudos específicos, como a expressão de peptídeos β -amiloide (A β), entre outras vantagens.

1.1 RESPALDO CIENTÍFICO

1.1.1 Modelo Experimental – *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

C. elegans é um nematoide não parasitário, de vida livre, encontrado na natureza principalmente em solos úmidos, com ampla distribuição ao redor do mundo. Se alimenta de diversas espécies bacterianas, principalmente aquelas que se desenvolvem na matéria vegetal em decomposição. Em laboratório, pode ser facilmente cultivado em placas contendo ágar ou em meios líquidos, ambos suplementados com *Escherichia coli* (*E. coli* OP50), fonte de alimento padrão utilizada (Markaki & Tavernarakis, 2020).

Este organismo multicelular simples existe majoritariamente na forma hermafrodita, com uma frequência ocasional de machos que varia em torno de 0,2%. Adultos têm aproximadamente 1mm de comprimento e cerca de 959 células somáticas. Por este fato, o arranjo anatômico de todas as células somáticas, bem como, toda a sua linhagem celular, já são bem estudados e conhecidos (Roussos et al., 2023). Seu sistema nervoso é completamente mapeado, com uma descrição precisa sobre a posição e a conectividade de cada um dos 302 neurônios, fornecendo a oportunidade única de estudar as funções neuronais, a formação dos circuitos neuronais e neurodegeneração (Cook et al., 2019). Além disso, os neurônios de *C. elegans* compartilham muitas características funcionais com os

neurônios de eucariotos superiores, incluindo neurotransmissores, receptores e neuromoduladores (Markaki & Tavernarakis, 2020; Roussos et al., 2023).

C. elegans possui um ciclo de vida curto, levando em torno de 3,5 dias desde o ovo até o fim dos quatro estágios larvais (L1, L2, L3, L4), quando atinge a maturidade e inicia a produção e postura de ovos. Sob condições ambientais favoráveis, como temperatura em torno dos 20°C e alimentação nutritiva, pode viver de 2 a 3 semanas. O verme selvagem pode gerar uma progênie que varia de 300 a 1000 ovos através de autofecundação ou fertilização por um macho, respectivamente (Markaki & Tavernarakis, 2020; Roussos et al., 2023).

Este verme possui o corpo transparente em todos os estágios do ciclo de vida, o que permite a visualização de toda sua composição interna, como faringe, intestino, gônadas, ovos, etc. Além disso, possibilita a utilização de marcadores fluorescentes para avaliação da integridade de circuitos neuronais e membranas intestinais, viabilizando a utilização de metodologias de manipulação não invasivas, com monitoramento óptico *in vivo* (Alvarez et al., 2022; Roussos et al., 2023).

Com seu genoma completamente sequenciado, de apenas 97Mb de tamanho (o genoma humano tem cerca de 3.200 Mb), estima-se que o nematoide possua 60 – 80% de genes homólogos com humanos. Estas características únicas, atreladas ao fato de se obter facilmente cepas mutantes e transgênicas que expressam fenótipos específicos, incluindo fenótipos patológicos de humanos, faz com que *C. elegans* seja escolhido como um modelo para a pesquisa nas ciências biomédicas (Markaki & Tavernarakis, 2020).

No que se refere às pesquisas no campo das doenças neurodegenerativas, o modelo de *C. elegans* se tornou essencial para a compreensão dos mecanismos moleculares e processos celulares que orquestram o desenvolvimento e a progressão da DA, bem como, para a descoberta de novos tratamentos (Alvarez et al., 2022; Kaletta & Hengartner, 2006). Modelos que expressam o peptídeo β -amiloide e a proteína tau forneceram informações extremamente relevantes para o entendimento dos mecanismos de toxicidade e seus possíveis supressores e ativadores. A ampla gama de ferramentas genéticas e estudos funcionais possíveis neste modelo, permitem uma caracterização detalhada dos efeitos de

cada variante gênica ou composto neuroprotetor, sendo excelentes para a triagem de potenciais fármacos e identificação de alvos terapêuticos (Alvarez et al., 2022; Markaki & Tavernarakis, 2020; Roussos et al., 2023).

Além de ser um sistema modelo geneticamente tratável, *C. elegans* é um bacterívoro que permite a observação direta, e em tempo real, de uma infecção e a modulação da expressão gênica envolvida neste processo *in vivo* (Sifri et al., 2003). Essas qualidades o tornam um hospedeiro modelo interessante para o estudo de infecções bacterianas e para avaliação dos desfechos subjacentes à exposição aos patógenos, permitindo acessar as consequências destas infecções no organismo hospedeiro, incluindo danos neurológicos e cognitivos associados (Irazoqui, Urbach, et al., 2010).

Este nematoide é particularmente proficiente para o estudo das respostas e defesas inatas do epitélio intestinal, pois possui 20 células que não são eliminadas, e não são renováveis, assim como os epitélios intestinais de mamíferos, permitindo o estudo de funções de defesa e resposta sem serem confundidas com proliferação celular e reparo tecidual (Irazoqui, Troemel, et al., 2010). Além disso, permite focar inteiramente na defesa inata epitelial do intestino, pois não possui sistema circulatório, fagócitos imunes semelhantes a macrófagos e imunidade adaptativa baseada em anticorpos (Harris et al., 2020; Sifri et al., 2005).

Como todos os modelos, *C. elegans* possui vantagens e limitações, no entanto, a capacidade deste de realizar estudos rápidos e simples com um grande número de indivíduos, *in vivo* e a baixo custo, além de contemplar a necessidade de utilização de animais não vertebrados e não sencientes, com todas as possibilidades de geração de mutantes e associações entre processos patológicos, representam grandes vantagens para estudos intermediários, onde há a compreensão de mecanismos moleculares associados à patogênese ou para a busca de novas estratégias terapêuticas para doenças como a DA (Alvarez et al., 2022).

1.1.2 Doença De Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica, progressiva e irreversível que constitui aproximadamente 80% dos casos de demência e afeta

principalmente a população acima dos 65 anos de idade (Alvarez et al., 2022; Alzheimer's Association, 2023). É caracterizada pela perda progressiva e dramática das funções cognitivas, com comprometimento severo da memória, pensamento confuso, dificuldade para resolver problemas e se comunicar, mudanças de humor e personalidade, alterações visuais e perda das habilidades sociais. Em conjunto, estas mudanças transformam atividades simples do dia a dia em situações consideravelmente mais difíceis, ou até mesmo impossíveis, tendo como consequência final a total dependência do indivíduo portador (Alvarez et al., 2022; Asik et al., 2021; Citron, 2010).

Do ponto de vista neuropatológico, a DA é determinada por dois aspectos característicos: as placas senis e a deposição de emaranhados neurofibrilares. As placas senis ou placas β -amiloide ($A\beta$), são agregados extracelulares do peptídeo $A\beta$, derivado da clivagem de uma proteína maior, a proteína precursora de $A\beta$ (PPbA), que está presente na membrana lipídica que reveste os neurônios (Long & Holtzman, 2019). Esses peptídeos provenientes dos processos desta proteína maior, possuem aspecto pegajoso e quando liberados no espaço extracelular se agrupam entre si e sobre a superfície dos neurônios, formando oligômeros neurotóxicos (Alzheimer's Association, 2023). Os pequenos agrupamentos de $A\beta$ podem bloquear a sinalização entre as células nas sinapses e ativar as células do sistema imunológico (microglia e astrócitos) que causam inflamações e destroem células deficientes por apoptose. Dentre outros fenômenos relacionados à neurotoxicidade dos agregados $A\beta$ estão: estresse oxidativo, alterações na homeostase do cálcio (Ca^{2+}), disfunção mitocondrial, deficiência de acetilcolina, neuroinflamação, e por fim, a morte neuronal (Ewald & Li, 2010; Long & Holtzman, 2019).

Já os emaranhados neurofibrilares são deformações na proteína tau intracelular (neurônios). Esta fosfoproteína atua como estabilizadora dos microtúbulos contidos nos neurônios e quando sofre ataque de agentes neurotóxicos, como os oligômeros $A\beta$, é hiperfosforilada e se converte em filamentos torcidos, desorganizando e destruindo a rede de conexão realizada pelos microtúbulos no neurônio (Holtzman et al., 2011). Isto leva a falhas na comunicação sináptica, problemas na distribuição de nutrientes e consequente morte neuronal. Com o passar do tempo, estas características se acumulam silenciosamente e se propagam através de regiões do sistema nervoso central (SNC), afetando uma grande

parte do cérebro, que vai perdendo massa e apresentando ventrículos (espaços preenchidos por fluido dentro do cérebro) cada vez maiores, como grandes buracos de deterioração (Alves et al., 2012; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023; Holtzman et al., 2011).

No estágio dos sintomas clínicos, esses processos fisiopatológicos já comprometeram significativamente uma grande proporção de circuitos cerebrais envolvidos na cognição. Isto ocorre principalmente nas regiões do córtex, conhecida por seu envolvimento com pensamentos complexos, planos e lembranças, e o hipocampo, que exerce papel importante na formação de novas lembranças (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023).

Apesar de a DA já ter seus aspectos clínicos e anatomo-fisio-patológicos bem descritos, o gatilho precursor no desenvolvimento da doença ainda é uma questão obscura. Sabe-se já, que diversos fatores como envelhecimento, estilo de vida, sedentarismo, alimentação, hereditariedade, qualidade de sono, etnia, gênero, entre outros, influenciam na progressão da doença, porém sem evidências claras de qual aspecto seria determinante. Mais recentemente, diversas condições patológicas como diabetes tipo 2, hipertensão, e outros, foram relacionados com a DA a nível fisiológico e molecular (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023; Long & Holtzman, 2019). Entre estes, um fator de risco que vem ganhando notoriedade, inclui as infecções microbianas. Sob esta perspectiva, diversos grupos de estudo ao redor do mundo, vem analisando a hipótese de que as infecções de modo geral, seriam o insulto inflamatório necessário para o desencadeamento da cascata de eventos característicos da doença. Apesar dos inúmeros estudos desenvolvidos, e dos diversos resultados observados, esta hipótese ainda não foi completamente comprovada.

1.1.3 Infecções e Doença de Alzheimer

Nas últimas décadas, a relação entre microrganismos (patógenos) e a DA se tornou uma hipótese bastante proeminente. Há indícios de que as infecções bacterianas e virais possam desencadear processos neurodegenerativos como os que ocorrem na DA (Ekundayo et al., 2021). De fato, diversos grupos de estudo vêm desenvolvendo trabalhos na tentativa de comprovar esta relação, obtendo muitos resultados que corroboram com esta ideia. Um dos trabalhos precursores neste contexto, que recebeu visibilidade, estudou as infecções pelo vírus herpes simplex tipo 1 [HSV-1] diretamente no cérebro de pacientes que faleceram

em decorrência da DA, onde conseguiram observar que o DNA destes vírus aparecia em maior abundância no cérebro de pacientes portadores da doença em comparação com tecido de pacientes sem a doença (Itzhaki et al., 1997). Este fato despertou interesse de muitos outros grupos que, ao longo dos últimos anos, vêm desenvolvendo diversas pesquisas na área.

Patógenos como *Chlamydia pneumoniae* (Balin et al., 1998), *Helicobacter pylori* (Malaguarnera et al., 2004; Uberti et al., 2022), *Borrelia burgdorferi* (Miklossy et al., 2006) *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* (Cattaneo et al., 2017), entre outros, foram relacionados à DA e à disfunção cognitiva. Alguns patógenos foram detectados diretamente no cérebro *post-mortem* de pacientes com DA e outros demonstraram capacidade de induzir a DA *in vitro* e em modelos *in vivo*. Outros estudos avaliaram o efeito de infecções sistêmicas, onde se revelou que, o acúmulo destas infecções ao longo da vida, está associado a níveis séricos elevados de peptídeo A β e atuam modificando processos neuroinflamatórios, principalmente no que se refere às células microgliais, o que sugere o envolvimento das infecções na progressão da DA (Bu et al., 2015; Rakic et al., 2018).

Evidências recentes mostram também que bactérias do trato gastrointestinal podem contribuir para o desenvolvimento da DA. Em particular, alterações na microbiota intestinal podem ativar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e aumentar a permeabilidade da parede intestinal levando ao desenvolvimento da resistência à insulina, o que também é um fator já associado à DA (Bostanciklioğlu, 2018; Li et al., 2020; Sochocka et al., 2019).

Além disso, as bactérias da microbiota intestinal já são conhecidas por excretar misturas imunogênicas contendo peptídeos amiloides, lipopolissacarídeos (LPS) e outros exsudatos microbianos no ambiente que os circundam, e essas substâncias podem apresentar caráter neurotóxico (Zhan et al., 2016; Zhao, Cong, et al., 2017). Amiloides bacterianos podem ativar vias de sinalização conhecidas por seu papel em processos neurodegenerativos e na patogênese da DA, além de aumentar as respostas inflamatórias que levam ao acúmulo do A β no cérebro (Brown, 2019; Zhan et al., 2018; Zhao, Jaber, et al., 2017).

Alguns mecanismos pelos quais as bactérias podem desencadear processos patológicos secundários como a DA envolvem a liberação de substâncias neurotóxicas, como por exemplo: espécies de *Lactobacillus* e actinobactérias podem metabolizar o glutamato e produzir ácido gama-aminobutírico (GABA) no intestino, o que influencia diretamente o aumento de GABA no SNC, através da fina conexão do eixo cérebro-intestino (Bostanciklioğlu, 2018; Hudec et al., 2015). Altos níveis de GABA em células neuronais podem levar à deficiência da memória, depressão e rompimento na formação de ligações sinápticas (Bostanciklioğlu, 2018; Mitew et al., 2013).

Durante uma infecção bacteriana ou alteração dos processos metabólicos da microbiota intestinal devido à inflamação, a concentração de LPS aumenta, o que pode induzir a neurodegeneração. Um estudo realizado por Hoogland et al. (2015) revelou que a administração de LPS em camundongos desencadeou ativação microglial, problemas de memória e danos neuronais. Brown (2019) demonstrou que LPS também promovem a agregação de A β e a formação de placas senis, que são importantes processos patológicos envolvidos no desenvolvimento da DA.

Outra hipótese recente na área, demonstra que as infecções podem estar associadas com o acúmulo de placas A β no cérebro, sugerindo a atuação antimicrobiana destas placas (Chen et al., 2022). Um estudo realizado com o modelo transgênico de *C. elegans*, que expressa o resíduo Ab₁₋₄₂ humano em suas células, mostrou um aumento do depósito destes peptídeos nos vermes ao serem expostos à *Candida albicans*, porém, a porcentagem de mortalidade foi menor no grupo que expressava o peptídeo em comparação com o grupo controle também infectado, indicando que as placas A β podem possuir efeito protetor e antimicrobiano. Neste mesmo estudo foram realizadas injeções intracerebrais de *Salmonella Typhimurium* em um modelo transgênico de camundongo (5XFAD), um modelo com patologia amiloide acelerada, onde foi possível observar a formação das placas A β nos mesmos locais de colonização bacteriana, sugerindo uma interação direta entre as entidades patogênicas (placas e bactérias). Corroborando com os resultados encontrados em *C. elegans*, camundongos que expressavam o peptídeo A β também tiveram a sobrevivência aumentada, sugerindo mais uma vez, o potencial caráter antimicrobiano dos agregados

amiloides, que ao tentarem proteger o cérebro da invasão microbiana, com o passar do tempo, acabam causando a neurodegeneração (Kumar et al., 2016).

Mesmo após tantos anos de pesquisa e descobertas relacionando as infecções com o possível desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, ainda há muitas lacunas na compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos (Barichello et al., 2022). Pesquisas adicionais contribuirão para esclarecer as ligações moleculares específicas que ocorrem entre estes eventos patológicos, explorar a especificidade de determinados microrganismos com variações patológicas na DA e identificar estratégias terapêuticas e preventivas para combater esta doença. Além disso, determinar características comuns à patógenos que contribuem para o desenvolvimento da DA a fim de identificar outros microrganismos patogênicos em potencial, através de semelhanças conhecidas, bem como, estabelecer possíveis interações entre os patógenos associados a outros fatores de risco (Seaks & Wilcock, 2020).

Com base nestes dados e com o objetivo de adicionar informações à hipótese e elucidar mais profundamente os mecanismos de atuação dos patógenos nas doenças neurodegenerativas, escolhemos duas bactérias de grande relevância clínica, que podem fazer parte da microbiota humana, mas também podem causar doenças graves, a gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* e a gram-positiva *Staphylococcus aureus*. São bactérias patogênicas já bem conhecidas, que representam duas grandes categorias de microrganismos evolutivamente distantes e ambas fazem parte do grupo ESKAPE (Irazoqui et al., 2010). Este grupo seletivo de microrganismos é um acrônimo que compreende seis patógenos bacterianos altamente virulentos e resistentes a antimicrobianos. Essas bactérias foram selecionadas por serem causas comuns de infecções nosocomiais, com risco de vida em indivíduos gravemente enfermos e imunocomprometidos, e são caracterizadas por apresentarem mecanismos de resistência a antimicrobianos (Santajit & Indrawattana, 2016).

De forma geral, *P. aeruginosa* causa infecções sistêmicas agudas em pacientes imunodeprimidos e infecções crônicas no pulmão de pacientes com fibrose cística (Lyczak et al., 2000, 2002). Também pode infectar uma variedade de plantas, metazoários e eucariotos unicelulares (Sifri et al., 2005). Já *S. aureus* pode causar diversas doenças severas em muitas espécies animais. A colonização humana por *S. aureus* é bastante difundida, 30% da

população carrega este microrganismo na microbiota do epitélio nasofaríngeo, na pele e no intestino, mas esta bactéria pode causar infecções graves de pele, osteomielite, endocardite, intoxicação alimentar, pneumonia, entre outros (Sifri et al., 2003). Estes patógenos utilizam um impressionante arsenal de fatores de virulência, incluindo toxinas, enzimas, citolisinas, biofilme, sistemas de secreção, etc., que causam a destruição de células e tecidos imunes do hospedeiro (Irazoqui et al., 2010).

Apesar da grande relevância clínica destes patógenos, ainda existem muitas lacunas de compreensão no que se refere à interação destes com o hospedeiro e como esta interação pode levar ao aparecimento de doenças como a DA. Tanto no que diz respeito à atuação do patógeno e seus fatores de virulência empregados, quanto às respostas do hospedeiro diante destas infecções, e como estes eventos estão relacionados com a neurodegeneração. Além disso, se faz necessário reconhecer quais os mecanismos e vias de sinalização envolvidos nestes processos e que culminam com a DA.

Corroborando com estas necessidades, o trabalho realizado por Chen et al., (2006) mostra que o peptidoglicano (PGN), componente extraído da parede celular de *S. aureus*, é capaz de ativar vias de sinalização envolvidas com processos de captação e deposição de peptídeos A β , bem como neuroinflamação em células microgliais. Processos que podem ter importante significado fisiopatológico na DA. Já os resultados do estudo realizado por Lim et al. (2022) mostraram claramente que o *S. aureus* aumentou os níveis de proteína A β em organoides amigdalíacos (3x) e organoides cerebrais (40x), o que pode estar relacionado ao aparecimento da DA. Curiosamente, os dados mostraram que a expressão de A β e a ruptura estrutural induzida pelo tratamento com *S. aureus* foi muito maior nos organoides cerebrais do que nos organoides amigdalíacos, sugerindo que a infecção pode representar desfechos mais drásticos para o cérebro do que outros órgãos.

O trabalho de Choi et al. (2022) demonstrou um aumento significativo de agregados da proteína tau no cérebro de camundongos infectados por *P. aeruginosa*, ondizentes com marcas características de DA. Além disso, o estudo de Wu et al. (2015) observou que a infecção por *P. aeruginosa* provoca alterações morfológicas nos neurônios sensoriais de *C. elegans*, onde foi possível visualizar degeneração axonal e brotamento neuronal aberrante semelhante ao observado em animais idosos e pacientes com doenças neurodegenerativas.

Estes estudos mostram as infecções como potencial fator de risco para o desenvolvimento da DA, mas ainda são bastante preliminares e evasivos. O invertebrado *C. elegans* é um poderoso hospedeiro modelo para estudar essas interações devido à sua simplicidade e métodos experimentais altamente desenvolvidos, podendo elucidar os mecanismos fundamentais da patogênese bacteriana e desfechos em doenças neurodegenerativas (Sifri et al., 2003). Um estudo realizado por Irazoqui et al. (2010), demonstrou que *P. aeruginosa* coloniza lentamente o intestino do *C. elegans*, produzindo vesículas de membrana relacionadas à virulência e causando anormalidades e acúmulo de material semelhante a biofilme nas células intestinais do verme. Em contrapartida, *S. aureus* coloniza rapidamente, rompendo microvilosidades e lisando células hospedeiras. Essas diferentes estratégias resultam em diferentes respostas do hospedeiro, o que pode elucidar quais mecanismos estão mais envolvidos com a formação de agregados A β (Roussos et al., 2023; Sifri et al., 2005).

1.1.4 Chalconas

Os flavonoides são compostos naturais bem conhecidos por suas diversas propriedades farmacológicas como anti-inflamatórios e antioxidantes, tornando-se potenciais agentes terapêuticos na DA (Freyssin et al., 2018). As chalconas (1,3-difenil-2-propenona) são os precursores na biossíntese destes flavonoides, e por isso, são consideradas estruturas simplificadas dos flavonoides. Possuem em sua estrutura básica dois anéis aromáticos unidos por três carbonos em um sistema de cetona α,β -insaturada, conforme demonstrado na figura 1 (Dewick, 2002; Mathew et al., 2019).

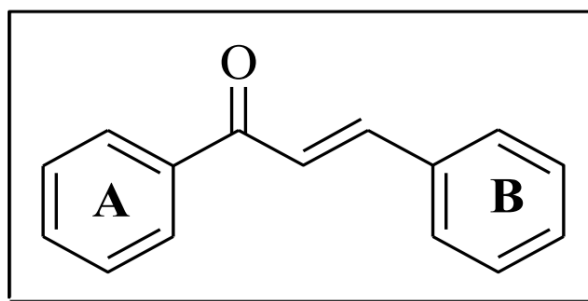


Fig. 1: Estrutura comum das chalconas (Mathew et al., 2019)

As chalconas não são importantes apenas como precursores de compostos naturais, mas também participam de várias modificações sintéticas com a introdução de diversos grupos funcionais, que podem ser acoplados tanto nos anéis aromáticos, como em substituição ao heteronúcleo (Mathew et al., 2019).

Estas características estruturais das chalconas fornecem uma gama de atividades terapêuticas como anti-inflamatória (Nowakowska, 2007), anti-câncer (Jandial et al., 2014), antioxidante (Mathew et al., 2017), antimicrobiana (Abdullah et al., 2014), antifúngica (Lahtchev et al., 2008), antiviral (Tadigoppula et al., 2013) e anti-diabética (Satyanarayana et al., 2004), etc. Também foram identificados derivados chalconoides para diversas desordens no SNC com efeitos antidepressivo (Guan et al., 2013; Mathew et al., 2014, 2016), ansiolítico (Jamal et al., 2008), inibidor de acetilcolinesterase (Hasan et al., 2005; Liu et al., 2014), com atuação em placas A β (Bag et al., 2013; Sashidhara et al., 2014) e inibição da mono-amino oxidase (Jo et al., 2013; Robinson et al., 2013), demonstrando a versatilidade e grande capacidade funcional destes compostos (Mathew et al., 2019).

Os trabalhos que demonstraram efeito anti-Alzheimer de derivados chalconoides incluem a inibição de acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, inibição da formação de placas A β e desagregação dos oligômeros pré-formados (Bag et al., 2013; Hasan et al., 2005). Também já foram observados aumento dos níveis de acetilcolina na junção sináptica com diminuição da agregação de A β (Sashidhara et al., 2014), porém os estudos ainda são bastante preliminares, havendo a necessidade de maior compreensão sobre os efeitos e mecanismos de atuação destes compostos nos processos neurodegenerativos (Mathew et al., 2019).

Com perspectivas futuras, a família dos flavonoides é atualmente analisada com potencial neuroprotetor e neurorestaurador (Zhao et al., 2018). A busca por um composto que reúna propriedades antioxidantes e antiagregantes também é de grande interesse nas desordens do SNC (Neganova et al., 2017). Além disso, estudos recentes apontam para a relevância de focar em tratamentos que tenham como alvo mitocôndrias, proteínas e enzimas relacionadas à autofagia para doenças como a DA (Kumar et al., 2018).

Assim, as chalconas são estruturas potenciais para o tratamento de doenças neurodegenerativas e a utilização destes compostos direcionados ao SNC, permanecem sendo de grande interesse no campo da química medicinal (Mathew et al., 2019). Estudos sobre a estrutura e funcionalidade das chalconas em relação a alvos cerebrais permite a otimização do seu potencial terapêutico, bem como a avaliação de toxicidade e biodisponibilidade (Freyssin et al., 2018; Mathew et al., 2019).

2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de patógenos bacterianos de grande relevância clínica no desenvolvimento de sinais e sintomas da DA e testar o efeito neuroprotetor de compostos chalconoides.

2.2 Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito da exposição aos patógenos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) na expectativa de vida de *C. elegans*.

2) Investigar se a exposição aos patógenos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) induz a um envelhecimento precoce nos animais.

3) Avaliar o efeito da exposição aos patógenos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) sobre a sinalização dopaminérgica, colinérgica e serotoninérgica (neurodegeneração).

4) Investigar a influência da exposição aos patógenos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) no acúmulo de peptídeos A β e déficit cognitivo.

5) Avaliar o efeito da exposição aos patógenos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase.

6) Avaliar o efeito neuroprotetor de compostos chalconoides através do tratamento prévio dos animais com os compostos e posterior exposição aos patógenos, realizando todos os ensaios mencionados anteriormente;

7) Investigar o potencial efeito terapêutico dos compostos chalconoides através do tratamento posterior à exposição dos vermes aos patógenos, realizando todos os ensaios mencionados anteriormente.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este projeto possui um esquema experimental dividido em três momentos conforme as figuras a seguir:

3.1 Grupo Infecção (GI):

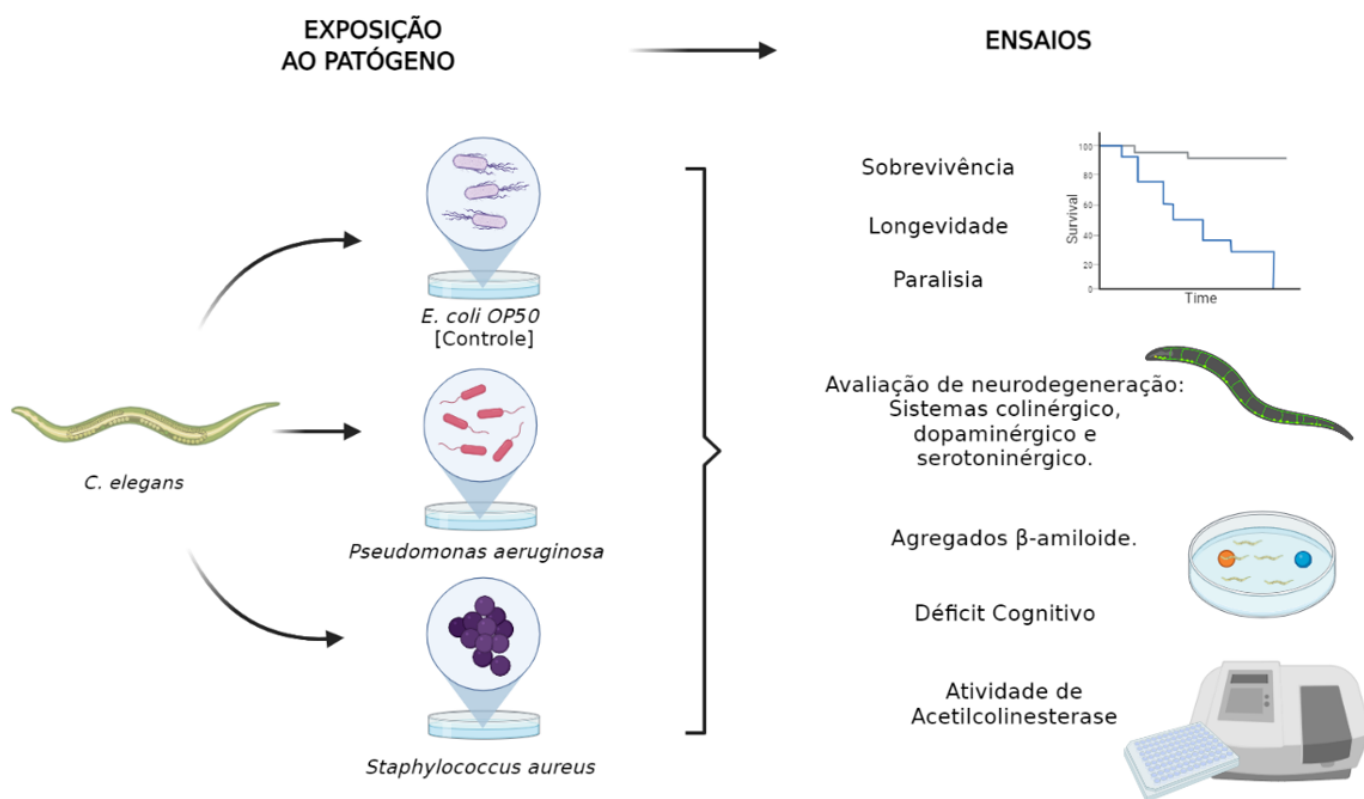


Figura 2: Esquema representativo do *design* experimental: "Grupo Infecção (GI)". Este grupo tem como objetivo acessar o impacto das infecções no desenvolvimento da DA e sinais de neurodegeneração, através da exposição das cepas de *C. elegans* (N2 [controle], GMC101, CL2006, bas-1, BY200, LX929 e NW1229) aos patógenos selecionados (*P. aeruginosa* e *S. aureus*).

3.2 Grupo Tratamento Pré-Infecção (GTPré):

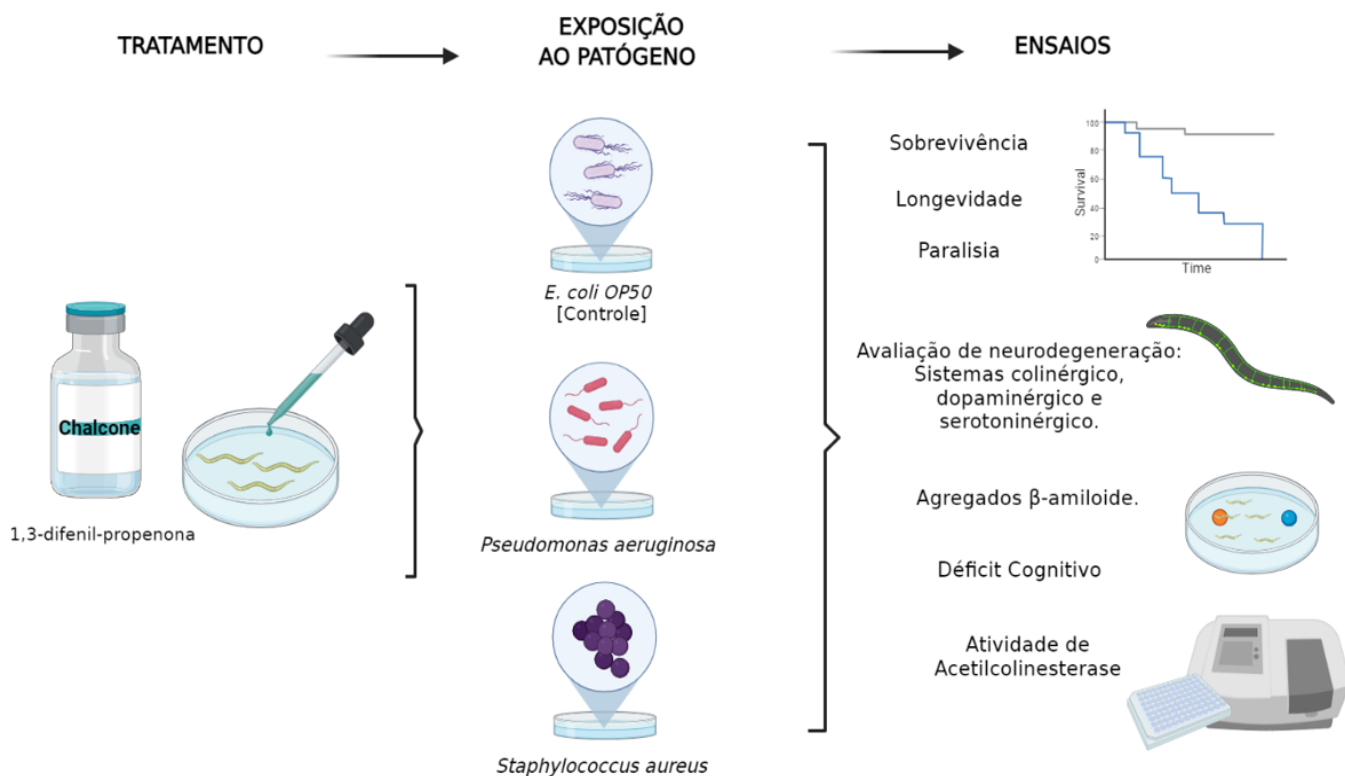


Figura 3: Esquema representativo do *design* experimental: “Grupo Tratamento Pré-Infecção (GTPré)”. Este grupo tem como objetivo acessar o efeito neuroprotetor dos compostos chalconoides, através da exposição das cepas de *C. elegans* (N2 [controle], GMC101, CL2006, bas-1, BY200, LX929 e NW1229) primeiramente aos compostos e posteriormente aos patógenos selecionados (*P. aeruginosa* e *S. aureus*).

3.3 Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós):

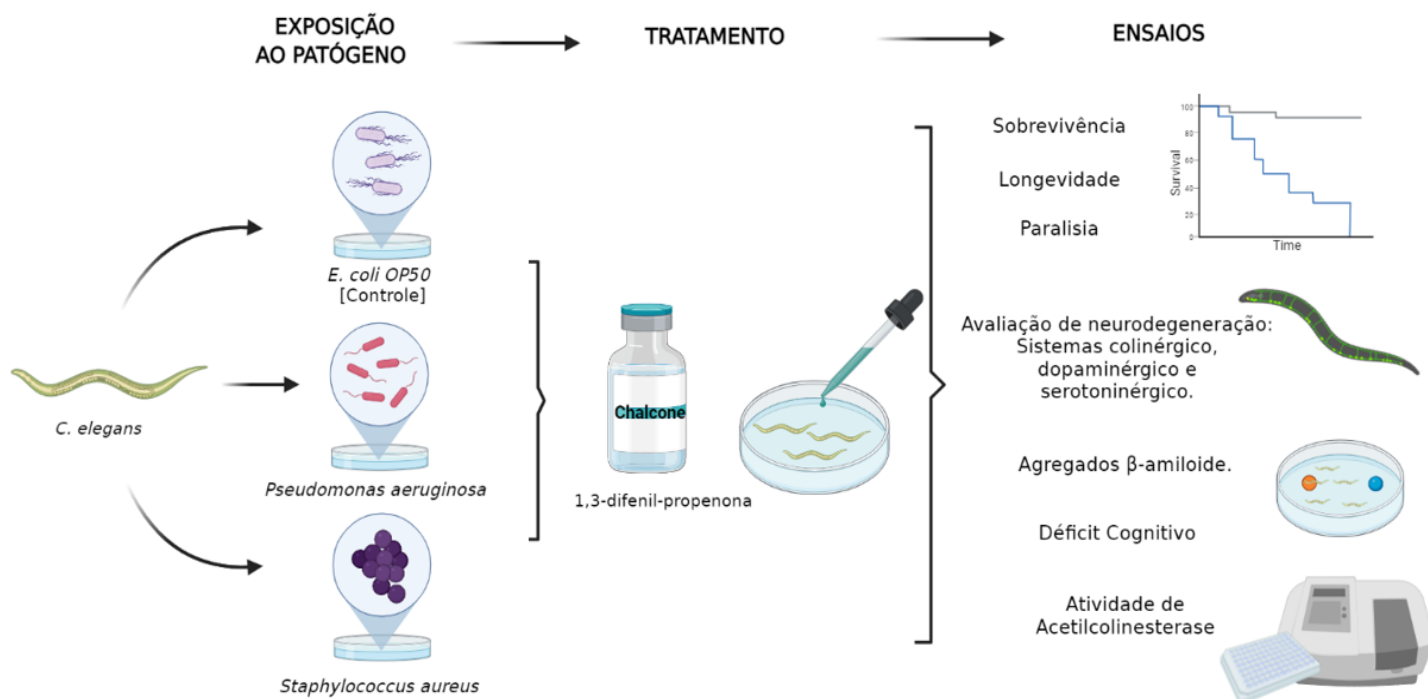


Figura 3: Esquema representativo do *design* experimental: “Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós)”. Este grupo tem como objetivo acessar o efeito terapêutico dos compostos chalconoides, através da exposição das cepas de *C. elegans* (N2 [controle], GMC101, CL2006, bas-1, BY200, LX929 e NW1229) primeiramente aos patógenos selecionados (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) e posteriormente ao tratamento com os compostos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Cepas bacterianas e de *C. elegans*

Cepas ATCC de *P. aeruginosa* e *S. aureus* serão utilizadas e 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*.

Para *C. elegans* serão utilizadas as cepas N2 [tipo selvagem], GMC101 [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP] e/ou CL2006 [*dvlIs2*(pCL12(*unc-54*/human-A β 1-42 minigene) + *pRF4*)] (cepas com marcação GFP nas células intestinais, que expressam peptídeo A β ₁₋₄₂ a 25°C nas células musculares, causando paralisia), BY200 [*dat-1p*::GFP] (cepa com GFP nos neurônios dopaminérgicos), bas-1 [BAS-1::GFP] (cepa com GFP nos neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos), LX929 [unc-17::GFP] (cepa com GFP em todos os neurônios colinérgicos) e NW1229 pan-neuronal [F25B3.3::GFP + *dpy-20*(+)] (cepa com expressão de GFP em todos os neurônios). As mesmas serão obtidas do Centro Genético de *Caenorhabditis*, da Universidade de Minnesota nos EUA. Todas serão mantidas a 20°C, em meio NGM (*Nematode growth medium*) e serão alimentadas com a bactéria *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50), fonte de alimento padrão para o modelo.

4.1.2 Compostos Naturais: Chalconas

Os compostos chalconoides serão sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Química Farmacêutica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em colaboração com a Professora Dra. Aline Rigon Zimmer, a qual coorienta este projeto.

4.2 MÉTODOS

Conforme delineamento experimental, segue metodologia proposta:

4.2.1 Grupo Controle

Além dos grupos infecção, pré-tratados e tratados com compostos chalconoides, haverá um grupo controle, onde as cepas serão alimentadas apenas com *E. coli* OP50, mas

passarão pelos tratamentos, para que haja parâmetro de comparação entre os grupos infectados e não infectados. Também será possível observar o efeito das chalconas na ausência da infecção.

4.2.2 Exposição aguda e crônica aos patógenos bacterianos – Grupo Infecção (GI)

Todas as cepas de vermes serão sincronizadas pelo método de hipoclorito (Porta-de-la-Riva et al., 2012) e posteriormente, quando chegarem ao estágio L4, serão submetidas a um protocolo de alimentação com *P. aeruginosa* e *S. aureus* por tempos predefinidos (diferentes tempos serão testados – exposição aguda e crônica). Os ensaios de sobrevivência, paralisia, acúmulo de A β , longevidade, atividade da enzima acetilcolinesterase, quimiotaxia, postura de ovos e avaliação da sinalização neuronal serão realizadas após a exposição aguda e crônica dos vermes aos patógenos bacterianos.

4.2.3 Tratamento com compostos chalconoides PRÉ exposição aos patógenos- Grupo Tratamento Pré-Infecção (GTPré)

Todas as cepas de vermes serão sincronizadas pelo método de hipoclorito e posteriormente, quando chegarem ao estágio L2, serão tratadas previamente com os compostos chalconoides escolhidos, diretamente no meio NGM, em diferentes concentrações, e posteriormente serão submetidas ao protocolo de alimentação com *P. aeruginosa* e *S. aureus* por tempos predefinidos (diferentes tempos serão testados – exposição aguda e crônica). Os ensaios de sobrevivência, paralisia, acúmulo de A β , longevidade, atividade da enzima acetilcolinesterase, quimiotaxia, postura de ovos e avaliação da sinalização neuronal serão realizadas após a exposição aguda e crônica dos vermes aos patógenos bacterianos.

4.2.4 Tratamento com compostos chalconoides APÓS exposição aos patógenos- Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós)

Todas as cepas de vermes serão sincronizadas pelo método de hipoclorito e posteriormente, quando chegarem ao estágio L4, serão submetidas ao protocolo de alimentação com *P. aeruginosa* e *S. aureus* por tempos predefinidos (diferentes tempos serão testados – exposição aguda e crônica) e posteriormente serão tratadas com os compostos chalconoides escolhidos, diretamente no meio NGM, em diferentes concentrações. Os ensaios de sobrevivência, paralisia, acúmulo de A β , longevidade, atividade da enzima

acetilcolinesterase, quimiotaxia, postura de ovos e avaliação da sinalização neuronal serão realizadas após o tratamento dos vermes com os compostos.

4.2.5 Sincronização

A sincronização consiste em um protocolo anterior aos ensaios para obtenção de vermes em um mesmo estágio larval. Este procedimento será realizado antes de todos os protocolos experimentais.

Vermes hermafroditas grávidos serão submetidos ao processo de sincronização, que consiste na utilização de uma solução de lise contendo hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio, para o rompimento da cutícula do verme, levando a liberação dos ovos. As placas contendo os mesmos serão mantidas em uma incubadora a 20°C com tampão M9 (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e NaCl) (Porta-de-la-Riva et al., 2012). Após 12-14 horas haverá a eclosão dos ovos e os vermes se encontrarão no estágio larval L1. Após esse período, os animais serão transferidos para placas de manutenção contendo meio NGM e alimentados com *E. coli* OP50 até o estágio L4.

Quando os animais estiverem nos estágios L2 e L4 (para grupo tratamento e grupo infecção, respectivamente) serão submetidos aos protocolos de tratamento e exposição alimentar, onde entrarão em contato com os compostos chalconoides e com as bactérias-teste (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) em meio NGM.

4.2.6 Ensaios

4.2.6.1 Ensaio de Sobrevivência

Neste ensaio as seguintes cepas de *C. elegans* serão utilizadas: N2, GMC101 e CL2006. Após a exposição aos patógenos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) e tratamentos, será quantificado o número de vermes vivos contidos em cada placa durante 72h, com avaliação a cada 12h.

4.2.6.2 Ensaio de Paralisia

Neste ensaio as seguintes cepas de *C. elegans* serão utilizadas: N2, GMC101 e CL2006. Vinte e cinco vermes no estágio larval L4, após sincronização, serão transferidos para placas NGM menores (60x15mm) contendo 50µL de *P. aeruginosa* ou *S. aureus* no centro da mesma onde os vermes serão dispostos. Essas placas serão mantidas a 25°C para que os vermes das

cepas GMC101 e CL2006 possam expressar o peptídeo A β . Durante 3 dias, esses 25 vermes serão transferidos diariamente para novas placas, até o fim do período reprodutivo. Passadas às 72 horas, cada verme presente nas placas será avaliado quanto à paralisia.

Os vermes serão classificados em 3 grupos: paralisados, semiparalisados e não paralisados. Os vermes que não conseguirem completar o movimento completo (um ponto de inflexão que atravessa todo o comprimento do corpo) provocado ou não por estímulo, somente movimentando a cabeça ou imóveis, porém com o batimento da faringe visível, serão considerados paralisados. Já os semi paralisados serão aqueles que após o estímulo movem-se lentamente, porém não conseguem sair do local em que estão. Já os não paralisados serão aqueles que conseguem migrar do ponto de origem mediante o estímulo ou não.

4.2.6.3 Ensaio de Longevidade

Nestes ensaios serão utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: N2, GMC101 e CL2006. Após a exposição aguda e crônica aos diferentes patógenos bacterianos, os vermes restantes nas placas do ensaio de paralisia serão transferidos para novas placas. Para mensurar o tempo de vida (longevidade) dos vermes das cepas GMC101 e CL2006, após indução da paralisia a 25°C, passadas as 72 horas após a avaliação da taxa de paralisia, os vermes serão transferidos novamente para a temperatura de 20°C e o número de vermes em cada placa será contado diariamente, até que não reste nenhum nematoide vivo. Como controle será utilizada a cepa N2, a fim de verificar se a temperatura de exposição não será a principal responsável pela redução do tempo de vida.

4.2.6.4 Atividade da Acetilcolinesterase

Nestes ensaios serão utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: N2, GMC101 e CL2006. Após o período de exposição a *P. aeruginosa* e *S. aureus*, aproximadamente 2.500 vermes serão recolhidos com solução salina (NaCl) para o processo de lavagem com tampão (Sacarose, Solução Tris-HCl e EDTA). Após o processo de lavagem, utilizando o tampão, o sobrenadante será removido e o restante do homogeneizado será congelado a -20°C. Os mesmos passarão por esse processo de congelamento e descongelamento, por 3 vezes. Após esta etapa, os vermes passarão por sonicador (3 pulsos de 10 segundos), para a obtenção do

homogeneizado. Posteriormente, os microtubos serão centrifugados a 10.000rpm durante 7 minutos e o sobrenadante será utilizado no ensaio.

Aproximadamente 50µL da amostra será utilizada para leitura em uma placa de 96 poços, contendo o sistema: tampão fosfato de potássio (TFK) e ácido 5,5'ditiobis (2-nitrobenzólico), e substrato (acetilcolina a 8mM). A leitura será realizada em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 412nm com intervalos de leitura de 30 segundos por 5 minutos.

4.2.6.5 Ensaio de quimiotaxia associada com a aprendizagem

Nestes ensaios serão utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: N2, GMC101 e CL2006. Com o intuito de verificar o déficit cognitivo e a sinalização dopaminérgica após exposição aguda e crônica a *P. aeruginosa* e *S. aureus* à 25°C, 5 vermes de cada grupo serão transferidos para novas placas e subdivididos em 2 grupos (grupo treinado e não treinado).

O grupo não treinado será aquele que não haverá ambientação na placa teste. O grupo treinado será aquele no qual os mesmos serão adaptados à presença do odorante atrativo butanona, o qual será disposto na tampa da placa, que também irá conter alimento. Isso permitirá que o verme através do odor aprenda a associar que a butanona é indicativo da presença de alimento.

Nas duas extremidades da placa teste haverá dois pontos: um contendo butanona+ azida de sódio e o outro contendo etanol+azida de sódio. Após 1 hora, o número de vermes em cada ponto da placa será determinado. O etanol é aversivo ao verme, porém é utilizado por um tempo determinado e em uma concentração baixa.

Serão utilizadas duas fórmulas para determinar o índice de quimiotaxia $[(n^{\circ} \text{ de vermes sobre a butanona} - n^{\circ} \text{ de vermes sobre o etanol}) / (\text{total vermes} - n^{\circ} \text{ de origem})]$ e o índice de aprendizagem $[\text{índice de quimiotaxia do grupo treinado} - \text{índice de quimiotaxia do grupo não treinado}]$.

4.2.6.6 Ensaio de postura dos ovos

Nestes ensaios serão utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: N2, GMC101 e CL2006. Este método será utilizado para avaliar os efeitos sobre a sinalização colinérgica e

serotoninérgica. Após 48 horas da exposição aguda e crônica a *P. aeruginosa* e *S. aureus* à 25°C, 2 vermes de cada grupo de exposição, assim como os controles (alimentados com *E. coli* OP50), serão transferidos para um poço de uma placa de 96 poços contendo 5% de levamisol para estimular a postura de ovos, e após será avaliada a quantidade de ovos que o animal expeliu.

4.2.6.7 Avaliação dos agregados A β

Nestes ensaios serão utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: N2, GMC101 e CL2006. Após a exposição a *P. aeruginosa* e *S. aureus*, os vermes das cepas GMC101 e CL2006 serão mantidas a 25°C para induzir a expressão do peptídeo A β . Para a visualização dos agregados A β será utilizado o corante X-34 (vermelho do Congo). Um verme de cada grupo será fixado a uma lâmina para posteriormente ser corado com solução de coloração (X-34, etanol 50%, Tris 10mM -pH 7.5) e descoloração (0.5% de hidróxido de potássio e 80% de etanol). Após a coloração, os agregados serão visualizados em microscópio EVOS™ M5000 Imaging System.

4.2.6.8 Avaliação do sistema colinérgico, dopaminérgico e serotoninérgico por marcação com GFP

Cepas utilizadas: N2, bas-1, BY200 e LX929. Os vermes das cepas contendo marcação com GFP nos neurônios colinérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos serão submetidos ao protocolo de exposição agudo e crônico com *P. aeruginosa* e *S. aureus* e após serão transferidos para lâminas microscópicas contendo agarose 2% e anestésico, e então serão observados em microscópio EVOS™ M5000 Imaging System.

4.2.6.9 Análise proteômica

As análises proteômicas serão realizadas em parceria com o Professor Dr. Eduardo J. Pilau no Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (Labiomass) junto ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Os animais serão sincronizados pelo método de hipoclorito de sódio e colocados em placas de NGM até chegarem ao estágio larval L4, quando passarão pelos protocolos de infecção e tratamento. Após, serão lavados das placas com tampão M9 e transferidos para

tubos cônicos onde serão lavados três vezes para reduzir a possibilidade de contaminação. Após este processo, os animais serão lisados em tampão de lise (6 M urea/ 2 M thiourea + 10 mM HEPES pH 8.0) e sonicados a 4°C em sonicador de ponteira (3 ciclos de 30s, com intervalo de 10s entre os ciclos) para extração do conteúdo proteico. Cerca de 5 -10mg de proteína serão necessários para os passos posteriores.

- Digestão proteica:

As proteínas serão digeridas de acordo com o protocolo descrito por Villén & Gygi (2008) com algumas modificações. Em resumo, as amostras serão diluídas com uma solução de ureia 8 mol L⁻¹ e reduzidas com 5 mmol L⁻¹ de ditionitrito (DTT) por 25 minutos a 56°C. Posteriormente, será realizada a etapa de alquilação com 14 mmol L⁻¹ de iodoacetamida, ao abrigo da luz em temperatura ambiente, seguida por uma extinção de DTT de 5 mmol L⁻¹ por 15 minutos sob as mesmas condições. Uma vez que as proteínas foram denaturadas, as amostras serão diluídas cinco vezes em uma solução de bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0) e adicionadas com 1 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio. Para a digestão, será utilizada uma proporção 1:50 de enzima:substrato de tripsina de tripsina (Promega, EUA), sendo as amostras incubadas a 37°C por 16 h para obtenção dos peptídeos tripticos finalizando o processo pela adição de ácido trifluoroacético 0,4%. Os peptídeos obtidos serão armazenados a -80°C até a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (nanoLC-MS/MS).

- Análise proteômica em *nanoLC-ESI-MS*^c:

O digerido proteico será analisado por meio de um cromatógrafo líquido de alto desempenho: ACQUITY UPLC M-Class System (Waters, Milford, MA) acoplado a um espectrômetro de massa Xevo G2, Waters (geometria Q-TOF) equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray*. A separação cromatográfica será realizada em uma coluna Acquity UPLC® M-Class HSS T3 (tamanho de partícula de 1,8 µm, 300 µm x 150 mm, Waters, Reino Unido), a uma taxa de fluxo de 6 µL min⁻¹. A mistura gradiente dos solventes A (H₂O com 0,1% de ácido fórmico; v:v) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; v/v) será a seguinte: 3% B (0-1 min), 40% B (1-80 min), 97% B (80-90 min), mantido a 97% B (90-97 min), 3% B (97-100 min) e mantido a 3% B (100-103 min) a 40°C.

A tensão capilar será operada no modo positivo, ajustada em 3,0 kV Capilar, Cone de amostragem 40 V, gás de desolvatação 600L h⁻¹/400°C. Os dados serão coletados de m/z 50 a 2000 usando uma aquisição MS^e, tempo de varredura = 0,5 e energia de colisão em rampa 15-45 V. Após LC-MS/MS, os arquivos de dados (brutos) serão processados e analisados usando o ProteinLynx Global Server™ 3.0.3 e as sequências serão pesquisadas no banco de dados Glycine max (soybean). Os parâmetros a seguir serão utilizados para pesquisas em bancos de dados: especificidade de clivagem, tripsina com 1 clivagem perdida permitida, mínimo de correspondências de íons de fragmento por peptídeo = 2, mínimo de correspondências de íons de fragmento por proteína = 5, mínimo de correspondências de peptídeo por proteína = 1, reagente modificador fixo: Carbamidometil C, Reagentes modificadores variáveis: Oxidação M.

4.2.6.10 Co-localização Bactéria x Agregados A β

Nestes ensaios serão utilizadas as seguintes cepas de *C. elegans*: N2, GMC101 e CL2006. Os vermes serão sincronizados pelo método de hipoclorito e quando chegarem ao estágio L4 passarão pelos ensaios de infecção, onde serão expostos aos patógenos que, desta vez, estarão marcados com fluoróforos. Utilizaremos *E. coli* OP50 marcada com GFP (verde), *P. aeruginosa* marcada com *mCherry* (rosa) e *S. aureus* marcada com E8FP (azul). Após os períodos de infecção, os vermes serão mantidos a 25°C para induzir a expressão do peptídeo A β . Para a visualização dos agregados A β será utilizado o corante X-34 (vermelho do Congo). Dez vermes de cada grupo serão fixados a uma lâmina para coloração conforme descrito anteriormente na seção 4.2.6.7. Após a coloração, os agregados formados e as bactérias serão visualizados em microscópio EVOS™ M5000 *Imaging System*, com sobreposição de imagens capturadas de um mesmo animal, a fim de verificar a possibilidade de co-localização das placas e bactérias.

4.2.6.11 Análise estatística

Os ensaios serão realizados em triplicata, em grupos de três experimentos independentes. Dados serão expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por Análise de Variância (Anova) e um valor $p \leq 0,01$ será considerado estatisticamente significativo. As análises de sobrevivência e longevidade em *C. elegans* serão determinadas usando o teste log-rank e curva de Kaplan-Meier, usando o software Graphpad Prism 9.0.

5. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Esperamos com este projeto colaborar para a consolidação das infecções bacterianas como fator de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer, desvendando através de um modelo experimental alternativo, se há uma associação entre estes dois eventos patológicos. Ainda, aprofundar a compreensão dos mecanismos que permeiam este processo e descobrir possíveis tratamentos alternativos a partir de compostos naturais, com o intuito de colaborar para a evolução das estratégias farmacológicas nas doenças neurodegenerativas.

6. CRONOGRAMA

ANO	Sem.	ATIVIDADE
2023	1º	• Escrita projeto; • Aproveitamento de créditos; • Ambientação e aprofundamento no manejo e manutenção do modelo (<i>C. elegans</i>); • Revisão da literatura.
	2º	• Apresentação projeto; • Experimentos: Grupo Controle e Grupo Infecção; • Disciplina; • Revisão da literatura.
2024	3º	• Experimentos: Grupo Infecção; • Prática Docente; • Revisão da literatura.
	4º	• Experimentos: Grupo Tratamento: Controle e Pré - infecção. • Prática Docente; • Seminário de dados; • Revisão da literatura.
2025	5º	• Continuação experimentos: Grupo Tratamento Pré-Infecção (GTPré); • Revisão da literatura.
	6º	• Experimentos: Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós); • Análise e tratamento de dados; • Qualificação; • Revisão da literatura.
2026	7º	• Experimentos: Grupo Tratamento Pós-Infecção (GTPós); • Análise e tratamento de dados; • Revisão da literatura.
	8º	• Escrita: Artigo e Tese • Análise e tratamento de dados; • Defesa.

REFERÊNCIAS

- Abdullah, M. I., Mahmood, A., Madni, M., Masood, S., & Kashif, M. (2014). Synthesis, characterization, theoretical, anti-bacterial and molecular docking studies of quinoline based chalcones as a DNA gyrase inhibitor. *Bioorganic Chemistry*, 54, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.03.006>
- Alvarez, J., Alvarez-Illera, P., Santo-Domingo, J., Fonteriz, R. I., & Montero, M. (2022a). Modeling Alzheimer's Disease in *Caenorhabditis elegans*. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020288>
- Alvarez, J., Alvarez-Illera, P., Santo-Domingo, J., Fonteriz, R. I., & Montero, M. (2022b). Modeling Alzheimer's Disease in *Caenorhabditis elegans*. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020288>
- Alves, L., Correia, A. S. A., Miguel, R., Alegria, P., & Bugalho, P. (2012). Alzheimer's disease: A clinical practice-oriented review. *Frontiers in Neurology*, APR. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00063>
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Asik, R. M., Suganthi, N., Aarifa, M. A., Kumar, A., Szigeti, K., Mathe, D., Gulyás, B., Archunan, G., & Padmanabhan, P. (2021). Alzheimer's disease: A molecular view of β -amyloid induced morbid events. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091126>
- Bag, S., Ghosh, S., Tulsan, R., Sood, A., Zhou, W., Schifone, C., Foster, M., Levine, H., Török, B., & Török, M. (2013). Design, synthesis and biological activity of multifunctional α,β -unsaturated carbonyl scaffolds for Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(9), 2614–2618. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.103>
- Balin, B., Gérard, H., Arking, J., Branigan, A. ·, & Todd, A. ·. (1998). Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae*. *Med Microbiol Immunol*.
- Barichello, T., Giridharan, V. V., Comim, C. M., & Morales, R. (2022a). What is the role of microbial infection in Alzheimer's disease? *Brazilian Journal of Psychiatry*, 44(3), 245–247. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2021-0037>
- Barichello, T., Giridharan, V. V., Comim, C. M., & Morales, R. (2022b). What is the role of microbial infection in Alzheimer's disease? *Brazilian Journal of Psychiatry*, 44(3), 245–247. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2021-0037>
- Bostanciklioğlu, M. (2018). Intestinal Bacterial Flora and Alzheimer's Disease. *Neurophysiology*, 50(2), 140–148. <https://doi.org/10.1007/s11062-018-9728-0>
- Brown, G. C. (2019). The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. In *Journal of neuroinflammation* (Vol. 16, Issue 1, p. 180). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7>
- Bu, X. L., Yao, X. Q., Jiao, S. S., Zeng, F., Liu, Y. H., Xiang, Y., Liang, C. R., Wang, Q. H., Wang, X., Cao, H. Y., Yi, X., Deng, B., Liu, C. H., Xu, J., Zhang, L. L., Gao, C. Y., Xu, Z. Q., Zhang, M., Wang, L., ...

- Wang, Y. J. (2015). A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 22(12), 1519–1525. <https://doi.org/10.1111/ene.12477>
- Chandra, S., Sisodia, S. S., & Vassar, R. J. (2023). The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00595-7>
- Chen, K., Iribarren, P., Hu, J., Chen, J., Gong, W., Cho, E. H., Lockett, S., Dunlop, N. M., & Ji, M. W. (2006). Activation of toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of alzheimer disease-associated amyloid β peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3651–3659. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508125200>
- Chen, D., Liu, X., Chen, Y., & Lin, H. (2022). Amyloid peptides with antimicrobial and/or microbial agglutination activity. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 106, Issue 23, pp. 7711–7720). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12246-w>
- Choi, C. S., Gwin, M., Voth, S., Kolb, C., Zhou, C., Nelson, A. R., deWeever, A., Koloteva, A., Annamdevula, N. S., Murphy, J. M., Wagener, B. M., Pittet, J. F., Lim, S. T. S., Balczon, R., Stevens, T., & Lin, M. T. (2022). Cytotoxic tau released from lung microvascular endothelial cells upon infection with *Pseudomonas aeruginosa* promotes neuronal tauopathy. *Journal of Biological Chemistry*, 298(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101482>
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 9, Issue 5, pp. 387–398). <https://doi.org/10.1038/nrd2896>
- Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., Nguyen, K. C. Q., Tang, L. T. H., Bayer, E. A., Duerr, J. S., Bülow, H. E., Hobert, O., Hall, D. H., & Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, 571(7763), 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>
- Coron, E., Flamant, M., Aubert, P., Wedel, T., Pedron, T., Letessier, E., Galmiche, J. P., Sansonetti, P. J., & Neunlist, M. (2009a). Characterisation of Early Mucosal and Neuronal Lesions Following *Shigella flexneri* Infection in Human Colon. *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004713>
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. Wiley.
- Ekundayo, T. C., Olasehinde, T. A., Okaiyeto, K., & Okoh, A. I. (2021). Microbial Pathogenesis and Pathophysiology of Alzheimer's Disease: A Systematic Assessment of Microorganisms' Implications in the Neurodegenerative Disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.648484>
- Ewald, C. Y., & Li, C. (2010). Understanding the molecular basis of Alzheimer's disease using a *Caenorhabditis elegans* model system. In *Brain Structure and Function* (Vol. 214, Issues 2–3, pp. 263–283). <https://doi.org/10.1007/s00429-009-0235-3>
- Freyssin, A., Page, G., Fauconneau, B., & Rioux Bilan, A. (2018). Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 13, Issue 6, pp. 955–961). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.233432>

- Giridharan, V. V., Generoso, J. S., Collodel, A., Dominghini, D., Faller, C. J., Tardin, F., Bhatti, G. S., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., & Barichello, T. (2021). Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Mediates Cognitive Impairment Triggered by Pneumococcal Meningitis. *Neurotherapeutics*, 18(1), 640–653. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00917-3>
- Guan, L. P., Zhao, D. H., Chang, Y., Wen, Z. S., Tang, L. M., & Huang, F. F. (2013). Synthesis of 2,4-dihydroxychalcone derivatives as potential antidepressant effect. *Drug Research*, 63(1), 46–51. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333229>
- Harris, T. W., Arnaboldi, V., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Cho, J., Davis, P., Gao, S., Grove, C. A., Kishore, R., Lee, R. Y. N., Muller, H. M., Nakamura, C., Nuin, P., Paulini, M., Raciti, D., Rodgers, F. H., Russell, M., Schindelman, G., ... Sternberg, P. W. (2020). WormBase: A modern Model Organism Information Resource. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D762–D767. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz920>
- Hasan, A., Khan, K. M., Sher, M., Maharvi, G. M., Nawaz, S. A., Choudhary, M. I., Rahman, A. U., & Supuran, C. T. (2005). Synthesis and inhibitory potential towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase of some variably substituted chalcones. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(1), 41–47. <https://doi.org/10.1080/14756360400015231>
- Health Organization, W. (2021). *Global status report on the public health response to dementia*. <http://apps.who.int/>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: The challenge of the second century. In *Science Translational Medicine* (Vol. 3, Issue 77). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>
- Hoogland, I. C. M., Houbolt, C., van Westerloo, D. J., van Gool, W. A., & van de Beek, D. (2015). Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>
- Hudec, J., Kobida, L., Čanigová, M., Lacko-Bartošová, M., Ložek, O., Chlebo, P., Mrázová, J., Ducsay, L., & Bystrická, J. (2015). Production of γ -aminobutyric acid by microorganisms from different food sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1190–1198. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6807>
- Irazoqui, J. E., Troemel, E. R., Feinbaum, R. L., Luhachack, L. G., Cezairliyan, B. O., & Ausubel, F. M. (2010). Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000982>
- Irazoqui, J. E., Urbach, J. M., & Ausubel, F. M. (2010). Evolution of host innate defence: Insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 47–58). <https://doi.org/10.1038/nri2689>
- Itzhaki, R., Lin, W., Shang, D., Wilcock, G., Faragher, & Jamieson, G. (1997). Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)10149-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)10149-5).

- Jamal, H., Ansari, W. H., & Rizvi, S. J. (2008). Evaluation of chalcones - A flavonoid subclass, for, their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 22(6), 673–681. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00639.x>
- Jandial, D. D., Blair, C. A., Zhang, S., Krill, L. S., Zhang, Y.-B., & Zi, X. (2014). *Curr Cancer Drug Targets* (Vol. 14, Issue 2).
- Jo, G., Ahn, S., Kim, B. G., Park, H. R., Kim, Y. H., Choo, H. A., Koh, D., Chong, Y., Ahn, J. H., & Lim, Y. (2013). Chromenylchalcones with inhibitory effects on monoamine oxidase B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(24), 7890–7897. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.004>
- Joshi, P., Perni, M., Limbocker, R., Mannini, B., Casford, S., Chia, S., Habchi, J., Labbadia, J., Dobson, C. M., & Vendruscolo, M. (2021). Two human metabolites rescue a *C. elegans* model of Alzheimer's disease via a cytosolic unfolded protein response. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02218-7>
- Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 5, Issue 5, pp. 387–399). <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kumar, A., Dhawan, A., Kadam, A., & Shinde, A. (2018). Autophagy and Mitochondria: Targets in Neurodegenerative Disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17(9), 696–705. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180816100203>
- Kumar, D. K. V., Choi, H. S., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L. E., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2016). Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(340). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1059>
- Lahtchev, K. L., Batovska, D. I., Parushev, S. P., Ubiyovk, V. M., & Sibirny, A. A. (2008). Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 2220–2228. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.12.027>
- Li, Z., Zhu, H., Guo, Y., Du, X., & Qin, C. (2020). Gut microbiota regulate cognitive deficits and amyloid deposition in a model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 155(4), 448–461. <https://doi.org/10.1111/jnc.15031>
- Lim, J. Y., Lee, J. E., Kim, H. K., Park, Y. J., Jeon, J. H., Park, S. A., Lee, N., Lee, I. H., Kim, D. H., Yang, S. H., Yoo, J., & Kim, S. W. (2022). Human Palatine Tonsils Are Linked to Alzheimer's Disease through Function of Reservoir of Amyloid Beta Protein Associated with Bacterial Infection. *Cells*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/cells11152285>
- Link, C. D. (1995). Expression of human f8-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. In *Neurobiology* (Vol. 92). <https://www.pnas.org>
- Liu, H. R., Liu, X. J., Fan, H. Q., Tang, J. J., Gao, X. H., & Liu, W. K. (2014). Design, synthesis and pharmacological evaluation of chalcone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(21), 6124–6133. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.033>

- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. In *Cell* (Vol. 179, Issue 2, pp. 312–339). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist*.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 2, pp. 194–222). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>
- Malaguarnera, M., Bella, R., Alagona, G., Ferri, R., Carnemolla, A., & Pennisi, G. (2004). Helicobacter pylori and Alzheimer's disease: A possible link. *European Journal of Internal Medicine*, 15(6), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2004.05.008>
- Markaki, M., & Tavernarakis, N. (2020a). Caenorhabditis elegans as a model system for human diseases. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 63, pp. 118–125). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.011>
- Mathew, B., Adeniyi, A. A., Joy, M., Mathew, G. E., Singh-Pillay, A., Sudarsanakumar, C., Soliman, M. E. S., & Suresh, J. (2017). Anti-oxidant behavior of functionalized chalcone-a combined quantum chemical and crystallographic structural investigation. *Journal of Molecular Structure*, 1146, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.100>
- Mathew, B., Parambi, D. G. T., Sivasankarapillai, V. S., Uddin, Md. S., Suresh, J., Mathew, G. E., Joy, M., Marathakam, A., & Gupta, S. V. (2019). Perspective Design of Chalcones for the Management of CNS Disorders: A Mini-Review. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 18(6), 432–445. <https://doi.org/10.2174/1871527318666190610111246>
- Mathew, B., Suresh, J., & Anbazhagan, S. (2014). SYNTHESIS, PRECLINICAL EVALUATION AND ANTIDEPRESSANT ACTIVITY OF 5-SUBSTITUTED PHENYL-3-(THIOPHEN-2-YL)-4, 5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE-1-CARBOTHIOAMIDES. In *EXCLI Journal* (Vol. 13).
- Mathew, B., Suresh, J., & Anbazhagan, S. (2016). Development of novel (1-H) benzimidazole bearing pyrimidine-trione based MAO-A inhibitors: Synthesis, docking studies and antidepressant activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20, S132–S139. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.09.015>
- Mayorca-Guiliani, A. E., Madsen, C. D., Cox, T. R., Horton, E. R., Venning, F. A., & Erler, J. T. (2017). ISDoT: In situ decellularization of tissues for high-resolution imaging and proteomic analysis of native extracellular matrix. *Nature Medicine*, 23(7), 890–898. <https://doi.org/10.1038/nm.4352>
- Miklossy, J., Kis, A., Radenovic, A., Miller, L., Forro, L., Martins, R., Reiss, K., Darbinian, N., Darekar, P., Mihaly, L., & Khalili, K. (2006). Beta-amyloid deposition and Alzheimer's type changes induced by Borrelia spirochetes. *Neurobiology of Aging*, 27(2), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.018>
- Mitew, S., Kirkcaldie, M. T. K., Dickson, T. C., & Vickers, J. C. (2013). Altered synapses and gliotransmission in alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiology of Aging*, 34(10), 2341–2351. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.010>

- Neganova, M. E., Klochkov, S. G., Petrova, L. N., Shevtsova, E. F., Afanasieva, S. V., Chudinova, E. S., Fisenko, V. P., Bachurin, S. O., Barreto, G. E., & Aliev, G. (2017). *SCIENCE BENTHAM*. <https://doi.org/10.2174/18715273156661611070905>
- Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 42, Issue 2, pp. 125–137). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.019>
- Pistollato, F., Cano, S. S., Elio, I., Vergara, M. M., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition Reviews*, 74(10), 624–634. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw023>
- Pistollato, F., Cano, S. S., Elio, I., Vergara, M. M., Giampieri, F., & Battino, M. (2016c). Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition Reviews*, 74(10), 624–634. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw023>
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: Synchronization and observation. *Journal of Visualized Experiments*, 64. <https://doi.org/10.3791/4019>
- Rakic, S., Hung, Y. M. A., Smith, M., So, D., Tayler, H. M., Varney, W., Wild, J., Harris, S., Holmes, C., Love, S., Stewart, W., Nicoll, J. A. R., & Boche, D. (2018). Systemic infection modifies the neuroinflammatory response in late stage Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0592-3>
- Robinson, S. J., Petzer, J. P., Petzer, A., Bergh, J. J., & Lourens, A. C. U. (2013). Selected furanochalcones as inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(17), 4985–4989. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.050>
- Roussos, A., Kitopoulou, K., Borbolis, F., & Palikaras, K. (2023a). *Caenorhabditis elegans* as a Model System to Study Human Neurodegenerative Disorders. *Biomolecules*, 13(3), 478. <https://doi.org/10.3390/biom13030478>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Sashidhara, K. V., Modukuri, R. K., Jadiya, P., Dodda, R. P., Kumar, M., Sridhar, B., Kumar, V., Haque, R., Siddiqi, M. I., & Nazir, A. (2014). Benzofuran-chalcone hybrids as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease: Synthesis and in vivo studies with transgenic *Caenorhabditis elegans*. *ChemMedChem*, 9(12), 2671–2684. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402291>
- Satyanarayana, M., Tiwari, P., Tripathi, B. K., Srivastava, A. K., & Pratap, R. (2004). Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12(5), 883–889. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.12.026>
- Schilling, L. P., Zimmer, E. R., Shin, M., Leuzy, A., Pascoal, T. A., Benedet, A. L., Borelli, W. V., Palmmini, A., Gauthier, S., & Rosa-Neto, P. (2016). Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET. In *Dementia e Neuropsychologia* (Vol. 10, Issue 2, pp. 79–90). Academia Brasileira de Neurologia. <https://doi.org/10.1590/S1980-5764-2016DN1002003>

- Seaks, C. E., & Wilcock, D. M. (2020). Infectious hypothesis of alzheimer disease. *PLoS Pathogens*, 16(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008596>
- Sifri, C. D., Begun, J., & Ausubel, F. M. (2005). The worm has turned - Microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. In *Trends in Microbiology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 119–127). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.003>
- Sifri, C. D., Begun, J., Ausubel, F. M., & Calderwood, S. B. (2003). *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71(4), 2208–2217. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2208-2217.2003>
- Sochocka, M., Donskow-Łysoniewska, K., Diniz, B. S., Kurpas, D., Brzozowska, E., & Leszek, J. (2019). The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 56, Issue 3, pp. 1841–1851). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1188-4>
- Tadigoppula, N., Korthikunta, V., Gupta, S., Kancharla, P., Khaliq, T., Soni, A., Srivastava, R. K., Srivastava, K., Puri, S. K., Raju, K. S. R., Wahajuddin, Sijwali, P. S., Kumar, V., & Mohammad, I. S. (2013). Synthesis and insight into the structure-activity relationships of chalcones as antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(1), 31–45. <https://doi.org/10.1021/jm300588j>
- Uberti, A. F., Callai-Silva, N., Grahl, M. V. C., Piovesan, A. R., Nachtigall, E. G., Furini, C. R. G., & Carlini, C. R. (2022). *Helicobacter pylori* Urease: Potential Contributions to Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/ijms23063091>
- Villén, J., & Gygi, S. P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 3(10), 1638. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.150>
- Wu, Q., Cao, X., Yan, D., Wang, D., & Aballay, A. (2015). Genetic screen reveals link between the maternal effect sterile gene *mes-1* and *pseudomonas aeruginosa*-induced neurodegeneration in *caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29231–29239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.674259>
- Xia, T., Horton, E. R., Salcini, A. E., Pocock, R., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2018). Proteomic Characterization of *Caenorhabditis elegans* Larval Development. *Proteomics*, 18(2). <https://doi.org/10.1002/pmic.201700238>
- Zhan, X., Stamova, B., Jin, L.-W., DeCarli, C., Phinney, B., & Sharp, F. R. (2016). Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. In *Genome Center*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003391>
- Zhan, X., Stamova, B., & Sharp, F. R. (2018). Lipopolysaccharide associates with amyloid plaques, neurons and oligodendrocytes in Alzheimer's disease brain: A review. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 10, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00042>
- Zhao, H.-F., Wang, G., Wu, C.-P., Zhou, X.-M., Wang, J., Chen, Z.-P., To, S.-S. T., & Li, W.-P. (2018). A Multi-targeted Natural Flavonoid Myricetin Suppresses Lamellipodia and Focal Adhesions Formation and Impedes Glioblastoma Cell Invasiveness and Abnormal Motility. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 17(7), 557–567. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180611090006>

- Zhao, Y., Cong, L., & Lukiw, W. J. (2017). Lipopolysaccharide (LPS) accumulates in neocortical neurons of Alzheimer's disease (AD) brain and impairs transcription in human neuronal-glial primary co-cultures. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(DEC). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00407>
- Zhao, Y., Jaber, V., & Lukiw, W. J. (2017). Secretory products of the human GI tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease (AD): Detection of lipopolysaccharide (LPS) in AD hippocampus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00318>



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROJETO DE DOUTORADO

TÍTULO: Análise da participação do sistema renina angiotensina e de citocinas inflamatórias na fibrose pulmonar: uma abordagem terapêutica

Candidata: Dra. Isabel Amaral Martins

Orientadora do Projeto: Prof^a. Dra. Katya Vianna Rigatto

1. RESUMO

A Fibrose Pulmonar (FP) é uma doença intersticial pulmonar com sobrevida média de três anos, que limita a capacidade respiratória dos pacientes e possui alta morbimortalidade devido à falta de opções terapêuticas. A etiologia e o mecanismo fisiopatológico da doença são bastante complexos e ainda desconhecidos, impossibilitando até o momento alternativas de tratamento que reduzam as internações e a necessidade de transplante pulmonar. No atual contexto da pandemia por COVID-19, torna-se ainda mais relevante o desenvolvimento desta pesquisa, visto que a Fibrose Pulmonar ocorre como uma consequência comum do desenvolvimento desta doença¹, sendo uma das sequelas que também compromete a perspectiva e a qualidade de vida dos pacientes. A hipótese mais aceita para a patogênese da doença é a fibroproliferação e o acúmulo excessivo de matriz extracelular. Tal evento no tecido pulmonar ocorre durante o reparo de lesões epiteliais alveolares, com a liberação de mediadores com atividade pró-inflamatória. Nesse sentido, fortes evidências demonstram o envolvimento do(s) sistema(s) renina-angiotensina (SRA) com a FP. Dados publicados do nosso laboratório mostraram, em pacientes com FP, uma significativa redução das concentrações plasmáticas de Alamandina (ALA), sem alteração nas concentrações plasmáticas dos demais peptídeos². De fato, está bem estabelecido na literatura que o eixo ECA-AngII-AT1 promove vasoconstrição, proliferação e fibrose, enquanto o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas induz intrinsecamente efeitos de proteção aos pulmões, contrapondo-se às ações geradas pelo eixo ECA-AngII-AT1. Acreditamos que, na FP, há um aumento proporcional da participação do eixo ECA-AngII-AT1 versus o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas e mais recentemente da ALA-MrgD, contribuindo para o desenvolvimento e o avanço da inflamação e do processo fibrótico. Pretendemos explorar o possível desequilíbrio nessa relação para confirmar os resultados obtidos até o momento no nosso laboratório na busca de alternativas de tratamento para esta doença. Possivelmente, mais importante do que bloquear o eixo fibrosante representado pela ECA-AngII-AT1, poderá ser facilitar a participação do eixo ECA2-Ang-(1-7)-ALA-MrgD. Portanto, o presente projeto pretende estudar os efeitos do tratamento com Alamandina, em pulmões de ratos com fibrose por bleomicina. Se confirmado que é possível tratar a fibrose pulmonar em ratos com a administração de alamandina, vislumbramos uma possibilidade promissora de tratar com ALA também seres humanos com FP. Apesar do evidente envolvimento do sistema renina angiotensina relacionados a FP, nenhum estudo foi encontrado na literatura demonstrando a participação desses eixos na fisiopatologia da doença. Cabe ressaltar ainda que o SRA não tem sido considerado clinicamente no tratamento da FP. Acreditamos que possivelmente isso se deva ao fato do uso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina e dos bloqueadores do receptor AT1 não tenham demonstrado benefícios aos pacientes com FP. No entanto, os avanços no conhecimento sobre o SRA e a descoberta recente de novos peptídeos, alteram a interpretação sobre este sistema, exigindo um novo olhar sobre a participação dos peptídeos com foco no estímulo ao eixo benéfico do SRA. Esta proposta é inédita e de grande interesse clínico, já que pretende investigar se o tratamento com ALA, e não a inibição dos efeitos

mediados pelo receptor AT1, diminui a lesão fibrótica no pulmão. Resultados publicados do nosso laboratório demonstram que a Alamandina apresenta efeito preventivo sobre o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina (dados submetidos à publicação). De fato, a Alamandina constitui um peptídeo com ações fisiológicas protetoras, muito convidativas do ponto de vista da fibrose. Previamente, demonstramos em pacientes com FP que há uma redução da concentração plasmática de Alamandina. Na presente proposta, pretendemos investigar se a alamandina será eficiente em tratar a inflamação e a fibrose. Nossa proposta foi contemplada no edital Decit/SCTIE/MS-CNPq-FAPERGS N°08/2020 e queremos aumentar a massa crítica nosso grupo para enriquecer as discussões e aumentar a força de trabalho competente. Assim, pretendemos contribuir com resultados que podem melhorar o manejo da FP, a qualidade de vida dos pacientes, reduzir o número de internações, de transplantes e dos custos para o Sistema Único de saúde.

2. RESUMO EM INGLÊS

Pulmonary Fibrosis (PF) is an interstitial lung disease with an average survival of three years, which limits the respiratory capacity of patients. Due to the lack of therapeutic options, it has high morbidity and mortality. Its etiology and pathophysiological mechanism are quite complex and still unknown. So far, there is no treatment to reduce hospitalizations and the need for lung transplantation. In the current context of the COVID-19 pandemic, the development of this research becomes even more relevant, since Pulmonary Fibrosis occurs as a common consequence of the development of this disease, being one of the sequelae that also compromises the perspective and quality of life of patients. Currently, the most accepted hypothesis for the pathogenesis of the disease is fibroproliferation and excessive accumulation of extracellular matrix. The event in the lung tissue occurs during the repair of alveolar epithelial lesions, with the release of mediators with pro-inflammatory activity. In this sense, strong evidence demonstrates the involvement of the renin-angiotensin systems (RAS) with PF. Published data from our laboratory, in patients with PF, showed a significant reduction in plasma Alamandin (ALA), without changes in the plasma of other peptides. In fact, it is well established in the literature that the ECA-AngII-AT1 axis promotes vasoconstriction, proliferation and fibrosis, while the ECA2-Ang- (1-7) -Mas intrinsically induces lung protection effects. We believe that, in FP, there is a proportional increase in the participation of the ECA-AngII-AT1 axis versus the ECA2-Ang- (1-7)-Mas and more recently of the ALA-MrgD, contributing to the development and advancement of inflammation and the fibrotic process. Thus, we intend to explore the possible imbalance between these two axes and search for alternative treatments for this disease. Possibly, more important than blocking the fibrous axis represented by ECA-AngII-AT1, could be to facilitate the participation of the ECA2-Ang- (1-7) -ALA-MrgD axis. Therefore, the present project intends to study the effects of Alamandin in the lungs of rats with bleomycin fibrosis. If confirmed that, in rats, is possible to treat fibrosis with almandine and that the pathophysiology of rats is similar to the results already obtained by our group in lung tissue from patients², we see a promising possibility of treating humans with PF with ALA as well. Despite the involvement of the renin-angiotensin system related to PF, no study has been found in the literature demonstrating the participation of these axes in the pathophysiology of the disease. It should also be noted that RAS were not considered clinically in the treatment of PF. We believe that this is possibly due to the fact that the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT1 receptor blockers have no benefit for patients with PF. However, advances in knowledge about RAS and the recent discovery of new peptides, alter the interpretation of this system, requiring a new look at the participation of peptides with a focus on stimulating the beneficial axis of RAS. This proposal is unprecedented and of

great clinical interest since it aims to investigate whether treatment with ALA, but not the inhibition of AT1 receptor, protects against fibrotic lesion in the lung. Published results from our laboratory demonstrate that an Alamandine has a preventive effect on the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis (data submitted for publication). In fact, an Alamandine constitutes a peptide with protective physiological actions, very inviting from the point of view of fibrosis. Previously, it shows in patients with PF that there is a reduction in the plasma concentration of Alamandine. In the present proposal, we intend to investigate whether an alamandine will be efficient in treating inflammation and fibrosis. Our proposal was contemplated in the announcement Decit/SCTIE/MS-CNPq-FAPERGS N°08/2020 and we want to increase the critical mass of our group to enrich scientific discussions and increase the competent workforce. Thus, we intend to contribute with the results that can improve the management of PF, the quality of life of patients, reduce the number of hospitalizations, transplants and costs for the Unified Health System.

3. INSERÇÃO, RELEVÂNCIA E IMPACTO DO PROJETO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO, QUALIDADE DE VIDA E/OU INOVAÇÃO

Para o desenvolvimento do presente projeto, a partir da definição do tema, foram selecionadas as palavras-chave (“pulmonar fibrosis” and “Renin Angiotensin System” and “rats” or “pulmonar fibrosis” and “alamandine”, ou “pumonary fibrosis” and “inflammatory cytokines” and “rats” ou “pulmonar fibrosis” e “oxidative stress”. A pesquisa de fontes e referências bibliográficas foi feita nas bases de dados PubMed, Scopus/Elsevier, Scielo, Web of Science, Google Scholar, entre julho e dezembro de 2020.

Entender os mecanismos fisiopatológicos que possam explicar o aparecimento e a progressão das doenças é a única maneira de saber onde, quando e como intervir para encontrar soluções para os problemas de saúde. O impacto que pode ser esperado dos nossos resultados se relaciona a elucidar parte da fisiopatologia da FP e propor uma nova opção para o seu tratamento, uma doença até hoje sem cura e que no momento, em razão da COVID-19, aumentou substancialmente o número de pessoas acometidas pela FP¹. Se os resultados preliminares de nosso laboratório nesta linha já contemplam 3 publicações científicas, resultados ainda mais consistentes tem o potencial de promover mais pesquisas, capacitar mais pessoal em nível de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado, divulgar mais conhecimento em revistas científicas de alto impacto, auxiliando a diminuir substancialmente a progressão da doença, melhorando o manejo de pacientes com FP. A investigação apresenta mais do que uma hipótese, apresenta resultados significativos de que o desequilíbrio entre os dois eixos do SRA tem um papel fundamental na FP idiopática e na fibrose experimental por BLM. Os ratos com FP-BLM apresentam características muito semelhantes à FP em humanos, inclusive aquela presente na COVID-19¹. Assim, os resultados

promissores com o tratamento com ALA poderiam ser muito úteis para tratar a fibrose inclusive causada pelo vírus SARS-CoV-2. Nossos resultados - em ANEXOS I a III ² e ANEXOS IV a VI ³, apontam para uma possibilidade real de encontrar uma opção que vai aumentar a eficiência para tratar uma doença progressiva sem cura e com impacto significativo na qualidade de vida de todos os pacientes com FP e dos (hoje) 4 milhões de pacientes recuperados da COVID-19 e que em grande parte também foram/serão acometidos pela FP.

Além disso, considerando os altíssimos custos da realização de transplantes para o SUS, a possibilidade de reduzir o número de pessoas que necessitam realizar transplante de pulmão representa uma economia importante para os governos com a saúde pública. Por todos esses resultados que esperamos concretizar, consideramos que o desenvolvimento desse projeto pode impactar significativamente na saúde das pessoas, no desenvolvimento científico, na inovação e na economia para o SUS por reduzir a necessidade de transplantes de pulmão.

Acreditamos que é importante cuidar das pessoas, seja formando profissionais da área básica de saúde em nível de pós graduação, e assim melhorando a qualidade do atendimento ao paciente, seja buscando alternativas práticas de diagnóstico ou tratamento para as doenças. É com este espírito que estamos trabalhando e com ele que vamos continuar na linha de pesquisa sobre a participação do SRA na FP, que passa a ser nosso foco de pesquisa para os próximos anos. A pandemia da COVID-19, chama a atenção do mundo inteiro sobre a necessidade de pesquisar para prevenir e/ou tratar os problemas de saúde. O pulmão está entre os órgãos afetados de forma contundente pela COVID-19. Será preciso atender e tratar os pacientes pra minimizar as sequelas.

Ressaltamos ainda que esta proposta está amplamente estruturada pelo depósito de uma patente internacional (provisória) em conjunto com uma Universidade Americana. Mas, para que nossas hipóteses possam vir a ser confirmadas e para avançarmos para estudos clínicos de fase I a IV, ainda precisamos confirmar alguns resultados. Só assim, haverá a possibilidade dos importantes achados sobre ALA, com ação antifibrótica nos pulmões, se reverterem em benefícios para a saúde das pessoas e, quem sabe, para a economia do País.

O grupo de pesquisa em Fisiologia Translacional da Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre agradece o apoio do CNPq que teve até hoje. Ele foi decisivo não apenas para a obtenção dos resultados que estão apresentados nos anexos desta proposta e submetidos a revistas científicas de impacto, mas também para o estabelecimento de parcerias. Hoje trabalhamos em colaboração com os pesquisadores Marli Knorst e Marcelo Gazzana do Hospital de clínicas de Porto Alegre, e internacionais como a bem estabelecida com o laboratório do Dr. Mohan Raizada do *Department of Physiology and Functional Genomics - College of Medicine, University of Florida* com

quem temos publicações de alto impacto e da pesquisadora Mariana Morris do *Institute of Neuro Immune Medicine and Institute of Cell Therapy, NOVA Southeastern University* em Fort Lauderdale, FL com quem a Supervisora compartilha o pedido de patente da ALA para tratar a fibrose.

Vislumbramos um futuro promissor e desafiante no horizonte da ciência realizada no nosso laboratório. Nossa maior motivação é, explorando a fisiopatologia das doenças, buscar soluções que melhorem a qualidade de vida das pessoas e qualifiquem profissionais da área da saúde. Não temos dúvidas de que estamos na direção certa e precisamos contar novamente com o suporte do CNPq.

Ao buscar, há alguns meses, integrar-me ao grupo de pesquisa liderado pela Dra Katya Vianna Rigatto, vim com o objetivo central de voltar a atuar prioritariamente como pesquisadora acadêmica, tendo em vista que a longa experiência docente em instituições privadas de ensino superior desde a conclusão de meu doutorado me estimulou a avançar e abraçar desafios de maior invergadura. Sempre tive grande interesse em participar ativamente como agente crítico da produção do conhecimento científico que há anos me dedico a compartilhar com meus discentes. Dada a relevância deste projeto para os fins citados, e pela oportunidade de aprimorar-me nesta nova área de meu interesse e também deste modo contribuir significativamente na busca da melhoria da qualidade de vida das pessoas, venho inscrever-me no presente edital para solicitar uma Bolsa de Pós-Doutorado Sênior a qual me permitirá realizar essas atividades com dedicação exclusiva.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E CONTEXTUALIZAÇÃO

4.1 Fibrose pulmonar

A Fibrose Pulmonar (FP) é uma doença intersticial pulmonar crônica que age de forma progressiva e que pode resultar em uma sobrevida média de apenas três anos^{4,5}, sendo a sua etiologia e o seu mecanismo fisiopatológico ainda desconhecidos⁵. Atualmente, a hipótese mais aceita para a patogênese da doença é a fibroproliferação e o acúmulo excessivo de matriz extracelular. Tal evento no tecido pulmonar ocorre durante o reparo de lesões epiteliais alveolares, com a liberação de mediadores com atividade pró-inflamatória.

Está estabelecido na literatura que a FP é associada ao envelhecimento e a uma condição fibrosante progressiva dos pulmões, possuindo relação com o tabagismo⁴. Os mais afetados por essa doença limitante são homens na sexta ou sétima décadas de vida (Baddini- Martinez et al., 2015). O acometimento dos pacientes vai muito além da limitação da capacidade respiratória. A doença ainda

apresenta sintomas como dispneia, fadiga e debilidade da musculatura respiratória e esquelética⁶ com redução da capacidade funcional dos pacientes. Está entre o grupo de doenças pulmonares intersticiais que causam maior mortalidade e morbidade respiratórias em todo o mundo pela falta de opções terapêuticas⁷. Além disso, representa alto custo pessoal e governamental no sentido de minimizar o sofrimento das pessoas acometidas pela doença.

Este conjunto de achados, que permanecem sem opções efetivas de tratamento para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, impedir o avanço da doença ou prover a sua cura, faz desta patologia um desafio a ciência.

5.2 Sistema renina-angiotensina e contextualização na fibrose pulmonar

Como um dos importantes sistemas que desempenha um papel-chave sobre diversos órgãos-alvo, como coração, vasos sanguíneos e, principalmente, pulmões, está o sistema renina-angiotensina (SRA). Este sistema, que pode ser simplificado com a figura a seguir⁸, exerce um controle importante e eficiente na manutenção da homeostase⁹. A ativação do SRA se dá pela conversão do angiotensinogênio em um decapeptídeo pouco vasoconstritor conhecido como angiotensina I (Ang I). Em seguida, Ang I é convertida no octapeptídeo angiotensina II (Ang II) através da enzima conversora de angiotensina (ECA).

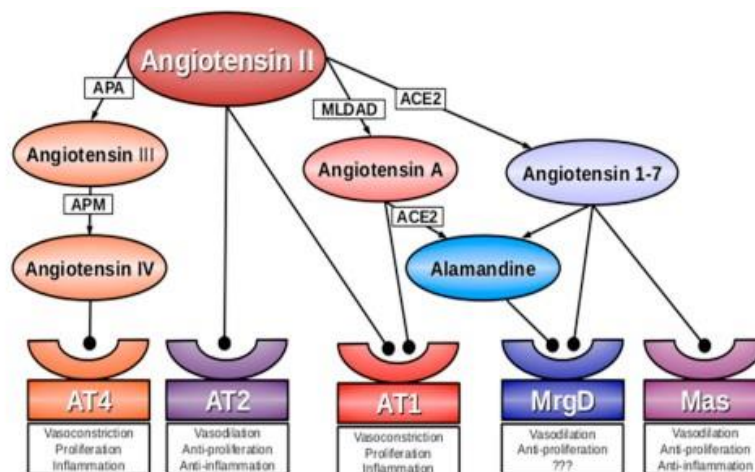


Figure 1. The position of the angiotensin A/alamandine/MrgD signaling pathway within the renin-angiotensin system. The “deleterious” molecules are marked in red/orange, the “protective” ones are marked in blue/purple. ACE2—angiotensin-converting enzyme type 2; AT1, AT2, AT3—angiotensin receptor type 1, 2 and 3, respectively, APA—aminopeptidase A; APM—aminopeptidase M; MLDAD—mononuclear leukocyte-derived aspartate decarboxylase.

A Ang II possui funções fisiológicas mediadas por dois receptores acoplados à proteína G, receptor de angiotensina I (AT1) e receptor de angiotensina II (AT2)⁹. O AT1 é o receptor mais envolvido nos efeitos clássicos da Ang II, como regulação da pressão arterial e homeostase de sódio

e água¹⁰. Quando ativado de forma exagerada, o AT1 pode induzir efeitos deletérios como fibrose, vasoconstrição, retenção de líquidos, apoptose, angiogênese, hipertrofia, estresse oxidativo e proliferação celular em diversos tipos celulares⁹, efeitos esses, classicamente observados na FP.

Por outro lado, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) exerce o papel de clivar a Ang II em angiotensina 1-7 (Ang 1-7), a qual se liga ao receptor Mas. A Ang 1-7 é conhecida por possuir efeito anti-hipertensivo, com capacidade de proteger os pulmões. Agindo como um peptídeo antagonista dos efeitos do eixo representado pela Ang II, a Ang 1-7 é vasodilatadora, antiproliferativa, antifibrótica e anti-inflamatória¹¹. Cabe observar, que estes efeitos são altamente desejáveis no sentido de se contrapor aos achados na FP.

De fato, está bem estabelecido na literatura que o eixo ECA-AngII-AT1 promove vasoconstrição, proliferação e fibrose, enquanto que o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas induz intrinsecamente efeitos de proteção aos pulmões, contrapondo-se as ações geradas pelo eixo ECA-AngII-AT1¹². O eixo envolvendo a ECA2 e a Ang (1-7) acaba por atenuar os efeitos vasoconstritores, proliferativos, fibróticos e inflamatórios da Ang II¹¹.

Além disso, estudos demonstram que o receptor AT1 de AngII está envolvido na fosforilação da proteína JNK, processo que desencadeia a apoptose de células epiteliais dos alvéolos pulmonares. A apoptose patológica de células epiteliais alveolares pode induzir a proliferação de fibroblastos, evento também envolvido na patogênese da fibrose pulmonar. Em contrapartida, a Ang 1-7, via receptor Mas, inibe a fosforilação da proteína JNK, evitando o processo de apoptose das células epiteliais alveolares¹³. Estes achados reforçam a participação dos dois eixos em diversos efeitos envolvidos na FP, sejam eles nocivos ou protetores.

Para tornar o desafio ainda mais estimulante, um novo peptídeo do SRA denominado Alamandina também possui ações vasoativas e de proteção parecidas com as da Ang 1-7. A Alamandina, um heptapeptídeo gerado pela ação catalítica da ECA2 sobre a angiotensina A ou diretamente sobre a Ang 1-7¹⁴, atua por meio do receptor MrgD e parece ser potente na contra regulação dos efeitos do eixo de ECA-AngII-AT1. Dessa forma, não apenas o eixo ECA2-Ang- (1-7)-Mas, mas também o ECA2-Alamandina-MrgD são promessas na promoção de efeitos que se opõem aos efeitos deletérios da AngII.

De fato, segundo um estudo com os antagonistas da angiotensina II houve uma redução no aparecimento de fibrose pulmonar em modelos animais mostrando que a Ang II desempenha um poderoso papel sobre a fibrogênese pulmonar¹⁵, sugerindo que, peptídeos que antagonizam os efeitos da Ang II, poderiam ter um papel importante na promoção e manutenção da saúde.

Apesar do grande envolvimento do SRA demonstrado pelos achados relacionados a FP,

nenhum estudo foi encontrado na literatura demonstrando a participação desses importantes eixos, ECA-AngII-AT1 e ECA2-Ang-(1-7)-Mas/Alamandina-MrgD o que faz a presente proposta uma pesquisa inédita. Uma das razões que poderia explicar a falta de interesse clínico no SRA para tratar a FP, provavelmente se deva ao fato de que o uso dos inibidores da ECA e dos bloqueadores do receptor AT1, não tenham trazido benefícios aos pacientes com FP. No entanto, os avanços no conhecimento sobre o SRA e a descoberta recente dos eixos possivelmente contra-regulatórios, alteram o cenário e a interpretação sobre este sistema. Há necessidade de um novo olhar sobre a participação desses peptídeos, especialmente para a possibilidade de estimular o eixo benéfico. Ficando demonstrada uma redução no tecido pulmonar do eixo ECA2-Ang-(1-7)/Alamandina-MrgD, se torna razoável acreditar que mais importante do que bloquear o eixo ECA-AngII-AT1, poderá ser estimular/restabelecer o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas/Alamandina-MrgD, facilitando o eixo anti-fibrótico.

De fato, resultados publicados do nosso laboratório de Fisiologia Translacional demonstram que pacientes com FP apresentam uma significativa redução na concentração plasmática de Alamandina (ANEXO I) ². Descobertas nesta direção contribuem para ampliar o conhecimento para encontrar formas mais eficientes no tratamento desta doença. Nesse sentido, nosso grupo depositou um pedido de patente provisória da alamandina para prevenir ou tratar a FP. Um dos grandes objetivos é melhorar a qualidade de vida dos pacientes e, ao mesmo tempo, reduzir os altos custos pessoais e governamentais com tratamento, internações e transplantes.

5.3 Envolvimento do Sistema-Renina Angiotensina no processo inflamatório:

O SRA, entre suas inúmeras ações, também é conhecido por ser ativado após lesão tecidual para promover a reparação tecidual. A AngII, o principal peptídeo efetor deste sistema, é reconhecida como um fator de crescimento que regula o crescimento celular e a fibrogênese. Trabalhos anteriores demonstraram a capacidade do parênquima pulmonar para produzir AngII extracelular local¹⁵. Há um aumento da AngII, e da expressão dos receptores AT1 e AT2 no tecido pulmonar de pacientes com FP^{15,16}. Células epiteliais alveolares e miofibroblastos têm sido identificadas como as principais fontes na geração de angiotensina¹⁵ o que reforça o envolvimento do sistema na fisiopatologia pulmonar.

Um dos efeitos da AngII é sua ação mitogênica para fibroblastos pulmonares humanos através da estimulação dos receptores AT1 e AT2¹⁶. O papel de AngII como potente indutor de síntese de DNA e proliferação de fibroblastos tem sido amplamente estudado. Foi demonstrado que ambos os receptores AT1 e AT2 mediam a sinalização da AngII no ciclo celular de fibroblastos e a

migração via fosforilação da proteína quinase *Mitogen-activated* p38 e p42 / 44. Além disso, a AngII promove a síntese de matriz extracelular (MEC) em fibroblastos de pulmão humano. O colágeno tipo I é a principal proteína da matriz no interstício pulmonar e, quando em excesso, esse colágeno sintetizado por fibroblastos ativados, participa na patogênese da fibrose. Entre outras ações, provoca espessamento das paredes alveolares e redução da complacência pulmonar. Tem sido demonstrado que a sinalização via AngII induz a produção de pro colágeno em fibroblastos normais.

Por outro lado, os antagonistas dos receptores AT1 anulam a síntese deste colágeno em fibroblastos isolados de tecido pulmonar humano fibrótico¹⁷. A síntese de MEC mediada pela AngII foi atribuída não apenas à ativação do receptor AT1, mas também à ação autócrina do fator de crescimento TGF- β 1¹⁷ e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (FCTC)¹⁸. Ambos os fatores de crescimento contribuem para o desenvolvimento de fibrose pulmonar, em parte por atuar na diferenciação de fibroblastos humanos e na síntese de colágeno. Estudos *in vitro* demonstraram que estes efeitos pró-fibróticos induzidos por TGF- β 1 e FCTC, bem como a síntese de colágeno gerada pelo estresse oxidativo, são anulados através do bloqueio dos receptores da AngII¹⁶⁻¹⁸.

Por outro lado, acredita-se que a regulação da transcrição e os sistemas de alça autócrina provavelmente estão envolvidos nos mecanismos moleculares pelos quais AngII exerce suas funções na fibrose pulmonar. Por exemplo, foi identificada uma ligação entre a AngII e o TGF- β 1 em fibroblastos isolados de pulmão fibrótico humano¹⁸. Ficou demonstrado que a transição para o fenótipo do miofibroblasto induzido por TGF- β 1 resulta em um aumento da expressão do receptor AT1^{17,18}. Da mesma forma, a expressão constitutiva de TGF- β 1, ativado por miofibroblastos de pulmão humano, foi suprimida pelo bloqueio do receptor de AngII. Esse bloqueio foi acompanhado pela inibição da síntese de colágeno¹⁷.

Recentemente, Renzoni e colegas¹⁸ descreveram um efeito adicional da AngII sobre a MEC e sobre células de fibroblastos de pulmão humano. Eles observaram que o aumento da contractilidade de fibroblastos isolados de pulmões fibróticos depende da sinalização da AngII via receptor AT1. Consequentemente, além dos efeitos mitogênicos e regulatórios, a AngII também pode modificar a função do citoesqueleto e das características mecânicas dos fibroblastos pulmonares humanos. Pouco se sabe sobre as potenciais ações pró-fibróticas da AngII nas células vasculares, dos macrófagos ou dos mastócitos do parênquima pulmonar. Isso se deve, em parte, ao fato de poucos estudos terem foco a partir da perspectiva do sistema local, SRA nos pulmões, e também porque a função destas células na fibrose pulmonar ainda é mal compreendida. Além disso, até a presente data, não há trabalhos na literatura com o objetivo de estudar o possível papel contra regulatório da Ang-(1-7) e/ou da Alamandina no processo fibrótico. Nossos achados demonstrando claramente

que pacientes com FP apresentam uma redução significativa das concentrações plasmáticas de Alamandina, indicam que, na fibrose, possivelmente exista uma diminuição do eixo benéfico do SRA representado pela ECA2-Ang-(1-7)-Mas e/ou ECA2-Ang-(1-7)-Alamandina-MrgD.

Vários fatores estão associados ao desenvolvimento de Fibrose Pulmonar (FP), como inalação de substâncias tóxicas, envolvimento de vírus e mesmo refluxo gastroesofágico, entretanto o processo exato pelo qual a FP se desenvolve ainda não é claramente conhecido¹⁸. Algumas características da FP incluem lesões e hiperplasia de células epiteliais alveolares, acúmulo de células inflamatórias, hiperplasia de fibroblastos, depósito e acúmulo de MEC. Apesar da presença de células inflamatórias no foco fibrótico, o papel que a inflamação desempenha no processo da FP ainda não está claro, visto que, clinicamente, pacientes não respondem a terapias imunossupressoras. Inclusive, o tratamento da FP com azatioprina e prednisona foi associado com uma maior mortalidade e hospitalização em um estudo recente¹⁹. Pirfenidona é um dos poucos fármacos existentes que demonstrou resultados promissores para o tratamento de FP em estudos clínicos, reduzindo o declínio da função pulmonar. Mesmo assim, o tratamento com pirfenidona não aumentou a sobrevida de pacientes diagnosticados com FP¹⁹.

Sendo assim, acreditamos que descobertas sobre o novo SRA e a importância dos eixos ainda pouco conhecidos que resultam na formação de Ang 1-7 e Alamandina podem representar uma nova alternativa de tratamento para esta doença incurável. Nossos resultados inovadores e a patente provisória que solicitamos pode contribuir para a redução dos altos custos para os cofres públicos e da imposição aos pacientes com FP de uma qualidade de vida extremamente precária. Precisamos encontrar alternativas de tratamento que mexam no paradigma, nada favorável ao sistema de saúde, onde muitas vezes a única opção para o paciente é o transplante pulmonar. Ainda precisamos considerar que, além do alto custo aos cofres públicos, essa opção nem sempre resulta no melhor desfecho. A sobrevida pós transplante é acompanhada de altos índices de mortalidade relacionados à disfunção primária, infecções e disfunção crônica do enxerto, principalmente sob a forma da síndrome da bronquiolite obliterante. Para suporte avançado de vida no período perioperatório, equipamentos de oxigenação extracorpórea e de suporte hemodinâmico vêm sendo utilizado como ponte para o transplante em pacientes gravemente doentes em lista de espera e para manter pacientes vivos até a resolução da disfunção primária do enxerto pós-transplante. Existe uma demanda reprimida de pacientes que necessitam de transplante pulmonar no Brasil e que nem sequer chegam a ser encaminhados a um centro transplantador²⁰.

A busca incansável de mecanismos e novos tratamentos é a combinação primorosa para o aumento de sobrevida do paciente com economia para os órgãos públicos. É urgente a realização

desses estudos para oferecer aos pacientes com fibrose pulmonar um tratamento efetivo que lhes dê a chance de viver mais e com melhor qualidade de vida.

5.4 Potencial terapêutico da Alamandina

Considerando todo o possível potencial benéfico do eixo ECA2-Alamandina- MrgD e o fato de resultados preliminares de nosso laboratório terem mostrado baixas concentrações plasmáticas de Alamandina em pacientes com FP comparados a indivíduos saudáveis² (ANEXO I a III), acreditamos no potencial deste peptídeo para melhorar o perfil oxidativo, participar da prevenção (dados submetidos), ou impedir o avanço do processo fibrótico nesta doença, quiçá tratá-lo. Quem sabe, no futuro, ainda estaremos contribuindo para a redução da progressão da FP e para o seu tratamento. Pretendemos contribuir para a melhora da qualidade de vida e da taxa de mortalidade desses pacientes.

Assim, no presente trabalho, o efeito desses tratamentos estará sendo avaliado em modelos experimentais de fibrose pulmonar *in vivo*. A nossa proposta é inédita, factível e, se nossas hipóteses forem demonstradas, pode gerar conhecimentos compatíveis com a melhoria do manejo da FP, da qualidade de vida dos pacientes e com a redução dos custos para o Sistema Único de saúde.

6. OBJETIVOS

6.1 Geral

- Avaliar o potencial terapêutico da alamandina (ALA) em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina (BLEO);

6.2 Objetivos Específicos

Avaliar efeitos da fibrose pulmonar induzida por BLEO, e do tratamento com ALA sobre:

- a concentração plasmática de peptídeos derivados dos eixos ECA-AngII-AT1 e ECA2-Ang-(1-7)-MAS/Alamandina-MrgD;
- a relação entre a expressão dos peptídeos (ECA, AngII, AT1, AT2, ECA2, Ang-(1-7), Mas, Alamandina e MrgD) do sistema renina-angiotensina em tecido pulmonar;
- a mecânica ventilatória, as variações hemodinâmicas e a atividade autonômica;
- o estresse oxidativo;
- a morfologia e a deposição de componentes de matriz extracelular do parênquima pulmonar de ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina;

In-vitro

~~Em fibroblastos de pulmões de animais com fibrose pulmonar induzida por bleomicina, e tratados ou não com Alamandina, avaliar:~~

- ~~-a relação entre os componentes (ECA, AngII, AT1, AT2, ECA2, Ang (1-7), Mas, Alamandina, MrgD) do sistema renina-angiotensina;~~
- ~~-a deposição de componentes de matriz extracelular;~~
- ~~-o perfil inflamatório e oxidativo;~~
- ~~-a diferenciação, proliferação e indução de transição do epitélio mesenquimal.~~

7 HIPÓTESES

- Há um desequilíbrio na relação entre expressão dos peptídeos do sistema renina-angiotensina em favor do eixo fibrosante;
- O tratamento *in vivo* com Alamandina melhora o perfil dos fatores pró-inflamatórios, o perfil oxidativo e a relação da expressão dos peptídeos do sistema renina-angiotensina em favor do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Alamandina-MrgD;
- O tratamento com Alamandina atua significativamente na reversão da fibrose pulmonar.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Local de execução: Estudo experimental realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

8.2 Animais e cálculo da amostra

O tamanho da amostra dos ratos foi calculado a priori, utilizando o programa SigmaPlot 11.0, para um erro alfa $\leq 0,05$ e um poder estatístico de 80% ($\beta=0,20$), baseado em pesquisas em modelos experimentais sobre fibrose pulmonar induzida por bleomicina^{21,22,23,24}.

Serão utilizados 70 ratos Wistar, distribuídos aleatoriamente em um grupo piloto (n=20) e mais 5 grupos experimentais (n=10/grupo), mantidos dois animais por caixa ao longo de todo o experimento. Os animais, recebidos com cinco semanas de vida, serão provenientes do biotério da UFCSPA. Ração e água serão fornecidas *ad libitum*, a temperatura ambiente será de 22 a 24°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00-19:00, período claro). Todos os procedimentos experimentais adotados para os animais obedecerão às normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)²⁵.

8.3 Grupos experimentais (n=10 cada)

- 1- Grupo Piloto
- 2- Grupo Controle (CO)
- 3- Grupo Alamandina (ALA)
- 4- Grupo Sulfato de Bleomicina = Fibrose pulmonar (BLEO)
- 5- Grupo Bleomicina + Alamandina (BLEO-ALA)
- 6- Grupo Bleomicina + Alamandina + Inibidor de Alamandina (BLEO-ALA-PD)

Grupo Piloto

Como o presente projeto propõe um novo protocolo, ampliado, de avaliação sobre o modelo de Fibrose Pulmonar induzida por Bleomicina em ratos, visando agora demonstrar efeitos terapêuticos da Alamandina ALA (diferentemente dos experimentos anteriores onde avaliamos efeitos preventivos), se faz necessário um pré teste para adequação da cronologia dos estágios da FP e do período de tratamento mais eficaz. O grupo piloto será dividido em: grupo fibrose sem tratamento e grupo fibrose tratado com ALA. Com esses 2 grupos pilotos pretendemos verificar se o tempo de 12 dias para iniciar o tratamento é factível e se os animais não tratados ao longo do período experimental apresentarão condições de vida digna e dentro dos critérios éticos (21,22,23,24). Além da doutoranda, esses animais também serão acompanhados pela coordenadora do projeto que é Médica Veterinária e muito preocupada com o bem estar animal. Da mesma forma, ao compararmos tempos de 14 ou 21 de tratamento com ALA (explicado nos itens abaixo) pretendemos verificar se o efeito terapêutico da ALA corresponde ao esperado ou se alguma modificação neste período deverá ser implementada.

8.4 Tratamentos dos animais

8.4.1 Indução da FP nos ratos: DIA 1

Os animais provenientes do Biotério Central, serão recebidos no laboratório experimental e mantidos por 7 dias para adaptação ambiental.

Após a adaptação dos animais, terão início os procedimentos experimentais, indicado como DIA 1. Para a indução da FP em ratos, será utilizado o modelo da inalação de Bleomicina (quimioterápico com ação antibiótica e antitumoral, proveniente do fungo *Streptomyces verticillus*).

A indução por via orofaríngea já é utilizada em nosso laboratório e é a alternativa mais segura e eficiente. O procedimento será realizado da seguinte maneira: sob efeito anestésico de cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) e os animais serão colocados em uma plataforma de intubação a um ângulo de 60°. A língua será cuidadosamente afastada com uma pinça romba para introdução cuidadosa de um cateter periférico, tamanho 20G, na cavidade oral através da epiglote até encontrar os anéis da traqueia. A visualização da traqueia ocorrerá com o auxílio de uma fibra óptica que estará acoplada ao cateter. A BLEO (2.5mg/kg, Bonar, Ache) ou solução salina (grupo CO e ALA) será administrada utilizando pipeta convencional. Ao mesmo tempo, as narinas serão gentilmente bloqueadas com uma pinça, até o líquido ser aspirado e desaparecer. Isso evita a respiração nasal e induz à inalação da BLEO. Logo após o procedimento, os animais receberão uma dose subcutânea de 5mg/Kg de cloridrato de tramadol, para ação analgésica no pós operatório. Todos os animais receberão soro fisiológico 0,9% aquecido pela via subcutânea e ficarão sobre uma plataforma aquecida para auxiliar na recuperação da anestesia. Os animais serão devolvidos às caixas somente após a recuperação completa²².

Os animais serão observados diariamente, para acompanhamento de efeitos dos procedimentos durante todo o período do experimento, sendo medido o peso a cada dois dias como forma de determinação do estado geral, e do bem-estar dos animais. Para minimização de desconforto ou mal-estar, será considerada limite a variação máxima de perda de 20% do peso inicial, como parâmetro de efeitos gerais do modelo experimental. Animais que ultrapassem este limite de 20% de perda de peso serão submetidos à finalização dos procedimentos experimentais antecipadamente ao prazo determinado pelo protocolo experimental.

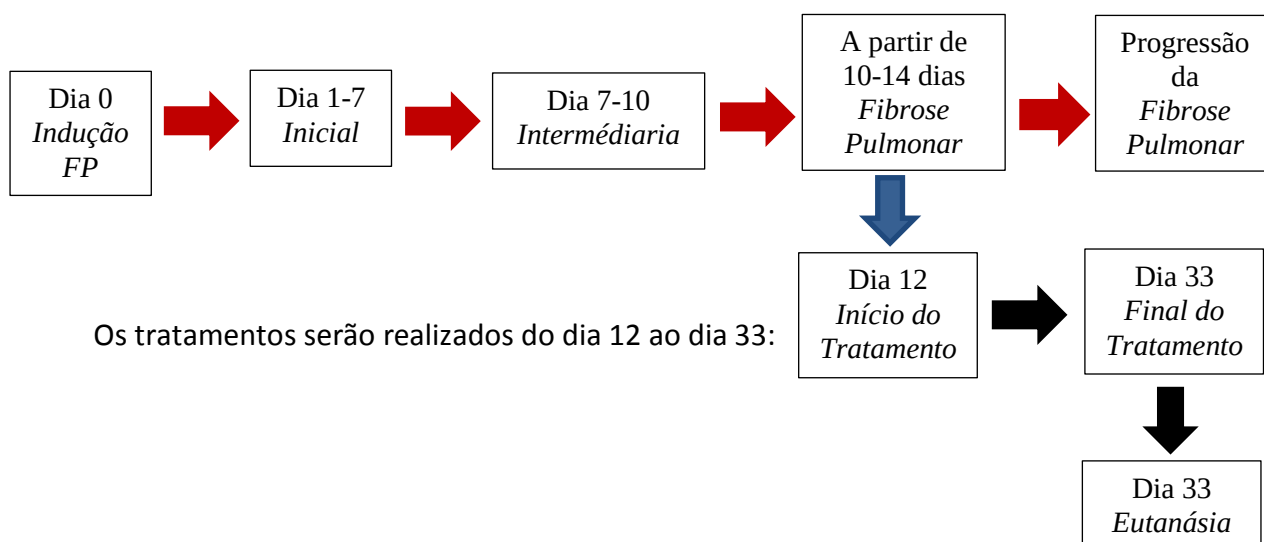
8.4.2 Tratamento com Alamandina/Inibidor de Alamandina – Início DIA 12

Considerando o tempo de desenvolvimento e estabelecimento da fibrose pulmonar induzida por Bleomicina em ratos^{22,23,24}, para a avaliação do possível efeito terapêutico da Alamandina, seguiremos etapas conforme descrito abaixo.

A partir do dia da *Indução*, considerado DIA 1, os animais serão mantidos em condições padrão pelo período de **12 dias** considerando o tempo para estabelecimento da FP, que segue uma fase *inicial* (do primeiro dia a aproximadamente uma semana após a instilação de Bleomicina, a qual se constitui de injúria pulmonar aguda, aumento das reações inflamatórias), seguida de uma fase *intermediária* (por volta da segunda semana, em que há aumento da ativação da JNK, apoptose

tecidual e proliferação de fibroblastos) e a fibrose pulmonar estabelecida (em geral ocorrendo entre 10 a 14 dias)^{22,23}.

Assim, considerando as etapas do desenvolvimento da FP induzida por Bleomicina descritas em revisão de literatura²³, apresenta-se o protocolo do experimento, em sequência temporal:



8.4.3. Implantação das mini bombas osmóticas – DIA 12

Os tratamentos serão realizados através de infusão subcutânea por mini-bombas (ALZET Osmotic Pump-DURECT Corporation) durante 21 dias, a partir do dia 12 após a indução da FP por sulfato de bleomicina (BLM).

No DIA 12, os animais serão anestesiados com Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg), e mini bombas osmóticas (OM; Alzet, 2004) contendo solução salina ou solução de alamandina serão introduzidas por via subcutânea a partir de uma incisão de 0,8cm no dorso dos animais, na linha da coluna, ao final da região cervical/início da região torácica, para difícil acesso pelo próprio animal. A incisão será suturada por 2 a 3 pontos simples com fio seda. Logo após a sutura, os animais receberão uma dose subcutânea de Cloridrato de Tramadol (5mg/Kg) na região dos flancos.

Os animais serão observados e mantidos acomodados em conforto térmico, até a completa recuperação da anestesia, quando serão recolocados em suas gaiolas.

O fluxo de liberação da solução (ALA 50mg/Kg em solução fisiológica ou somente solução fisiológica NaCl 0,9%) pelas mini bombas será de 0,25µL/hora, durante 24h/dia, ao longo de todo o período de tratamento.

A concentração aplicada, tanto de ALA, quando do inibidor, está baseada em adaptação do

protocolo utilizado em experimento anterior em nosso laboratório (dados submetidos), onde foram avaliados efeitos do uso da Alamandina na prevenção da FP.

8.4.4. Resumo da descrição dos tratamentos por grupo

- **Grupo 1 (CO):** controle, será submetido à instilação de 0,2ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) no DIA 1, e receberá infusão de solução fisiológica (NaCl, 0,9%; fluxo de 0,25µl/h), do 12° ao 33° dia.
- **Grupo 2 (ALA):** controle ALA, será submetido à instilação de 0,2ml de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) no DIA 1 e receberá solução de Alamandina (50µg/kg; obtida do Tocris Bioscience - Bristol, UK), diluída em solução fisiológica, fluxo de 0,25µl/h, do 12° ao 33° dia.
- **Grupo 3 (BLEO):** indução de FP por sulfato de bleomicina no DIA 1 (BLM; Biosintética, São Paulo, Brasil - dose de 1,5U diluído em 0,2ml de solução fisiológica), e infusão de veículo (solução fisiológica NaCl 0,9%; fluxo de 0,25µl/h) do 12° ao 33° dia.
- **Grupo 4 (BLEO-ALA):** indução de FP no DIA 1, tratamento com infusão de Alamandina (50µg/kg; obtida do Tocris Bioscience - Bristol, UK), diluída em solução fisiológica NaCl 0,9%; fluxo de 0,25µl/h, do 12° ao 33° dia.
- **Grupo 5 (BLEO-ALA-PD):** indução de FP no DIA 1, tratamento com infusão de Alamandina (50µg/kg – Tocris Bioscience – Bristol, UK), acrescentando-se o inibidor de Alamandina – PD (30ug/kg PD-123319 -Tocris Bioscience, Bristol - UK), diluídos em solução fisiológica NaCl 0,9%; fluxo de 0,25µl/h, do 12° ao 33° dia.

Ao final dos tratamentos, no dia 33, os animais serão anestesiados e submetidos aos procedimentos para avaliação da Mecânica Ventilatória, Análises Hemodinâmicas e Autonômicas. A seguir, serão eutanasiados por sobredose anestésica e será feita a coleta das amostras a serem analisadas.

8.5 Medidas da Mecânica da Ventilação Pulmonar – DIA 33

Para avaliação dos efeitos da fibrose pulmonar induzida por Bleomicina, e dos tratamentos experimentais, sobre a mecânica ventilatória, após o período de 21 dias de infusão das soluções pelas mini bombas, no DIA 33, os animais serão anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), serão posicionados na mesa cirúrgica e traqueostomizados para a introdução de uma

cânula rígida (2-mm ID). A cânula será fixada à traquéia por um fio de seda e conectada ao ventilador mecânico. A função respiratória será medida usando um ventilador mecânico para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Montréal, Canada). Logo após a medida da mecânica ventilatória, serão feitas as análises hemodinâmicas e a avaliação da atividade autonômica.

8.6 Análises Hemodinâmicas e Avaliação da Atividade Autonômica – DIA 33

Registros hemodinâmicos serão realizados em todos os grupos logo após a avaliação da Mecânica Ventilatória, portanto também no 33º dia. Nos animais, ainda anestesiados com cetamina (80mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) será feita a cateterização, conforme procedimento cirúrgico descrito por Waynforth e Flecknell. Cânulas serão inseridas na artéria carótida para medir a pressão arterial sistêmica (PA); e no ventrículo direito (VD), através da veia jugular, para registro de pressão ventricular direita. A pressão sistólica do ventrículo direito e a pressão diastólica final do ventrículo direito (PSVD e PDFVD, respectivamente), e a pressão arterial sistólica e diastólica serão monitoradas através de um transdutor de pressão (modelo 041-500503A – CDX III Transducer With Male/Male Linden Fittings®, Argon, Athens, TX, EUA), calibrado e conectado a um amplificador de sinais (General Purpose, Stemtech®, Wood Dale, IL, USA) e então transformados para o software (CODAS – Data Acquisition System®, PC) com frequência de amostragem de 2000 Hz, expressos em mmHg. Ao final destas medidas, será coletado o sangue pela mesma via da canulação (volume em torno de 3ml), será aplicada sobredose anestésica para a eutanásia, e em seguida será feita a retirada de órgãos e tecidos.

8.7 Eutanásia dos Animais e Coleta de Tecidos – DIA 33

Após os procedimentos de avaliação da mecânica ventilatória e das análises hemodinâmicas e autonômicas, com os animais ainda anestesiados será coletado o sangue e em seguida será feita a eutanásia por sobre dose de Cetamina (240mg/Kg) e Xilazina (30mg/Kg). Após a eutanásia, serão retirados os pulmões, coração, cérebro, rins e fígado, sendo pesados e processados para posteriores análises. Sangue e pulmões serão tratados para as análises das etapas do presente projeto, e cérebro, coração, rins e fígado serão adequadamente armazenados em freezer -80°C para posteriores avaliações em sequência.

8.8 Análise da Participação de Peptídeos do SRA Pulmonar - Western-blot²⁶

Após a extração, parte do tecido pulmonar **direito** será imerso de forma imediata em nitrogênio líquido, mantido em freezer -80°C, para posterior avaliação da expressão proteica da

ECA, da ECA2 e dos receptores AT1, AT2, Mas e MrgD por meio da técnica de Western-blot. **Todos os lobos do pulmão direito serão macerados para homogeneização das amostras a serem analisadas.** No isolamento de proteína, um tampão contendo 20 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de EDTA, Glicerol 10% e 20 mmol/L de PMSF será utilizado para que as amostras sejam descongeladas. Em seguida, as amostras serão homogeneizadas em um homogeneizador Politron, durante 40 segundos. Para normalizar a quantidade de proteína, 60 mg de proteína serão expostas à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE), através de um sistema descontínuo que utiliza gel 10-14%. A transferência das proteínas separadas acontecerá por eletroforese para membranas, utilizando tampão contendo Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20% (v/v) e SDS 0,02% (p/v) (pH=8,2), em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Em seguida, os sítios de proteínas inespecíficas serão bloqueados através de 1h de incubação em solução bloqueadora 5% (p/v) de leite desnatado em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas serão processadas através de imunodeteção com uso de anticorpos primários: anticorpo anti-ECA2 de coelho (Genetex®) e anticorpo policlonal anti-ECA de camundongo (Millipore®). Os seguintes anticorpos serão usados nas sondagens: anticorpo policlonal anti-AT1 de coelho (Alomone®), anticorpo policlonal anti-AT2 de coelho (Alomone®), anticorpo policlonal anti-Mas de coelho (Alomone®) e anticorpo policlonal anti- MrgD de coelho (Alomone®). O padrão de peso molecular RPN 800 (rainbow full range Bio-Rad, CA, USA) será utilizado como referência para a determinação dos pesos moleculares das bandas de proteínas. A intensidade de bandas será determinada por análise de densitometria, através do sistema Image Master VDS® (Pharmacia Biotech™). A normalização dos resultados será feita com o uso de anticorpo anti-GAPDH (Millipore®). Por fim, as amostras serão incubadas com anticorpos secundários anti-IgG conjugados com peroxidase (HRP), que reagem com um substrato quimioluminescente e permitem a revelação das bandas que serão avaliadas através do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

8.9 Identificação de Citocinas Inflamatórias

Todo o tecido pulmonar direito será coletado e, na sua totalidade, macerado e homogeneizado em salina estéril. Após homogeneização, amostras serão centrifugadas (3000 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante será utilizado em alíquotas para avaliar os níveis de citocinas por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando kits comerciais. Primeiramente as placas de 96 poços serão incubadas a 4°C overnight com anticorpos contra as proteínas de interesse (TGF- β 1, IL-6, IL-10, MCP1, INF- γ , TNF- α e IL-12P70). No dia seguinte, as placas serão lavadas e incubadas durante 1 hora com solução de albumina bovina a 1%, no intuito de evitar ligações inespecíficas.

Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão e alíquotas das amostras serão adicionadas e incubadas a 4°C por 24 h. As placas serão novamente lavadas e os anticorpos policlonais diluídos serão adicionados (100µL/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas serão lavadas e 50µL de enzima avidina-HRP diluída 1:5000 será adicionada. Em seguida (trinta minutos após), 50µL do reagente colorido OPD (solução 0,4 mg OPD – 0,4µL H₂O₂ – 1 mL tampão) será adicionado e as placas serão mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 minutos. A reação enzimática será interrompida com H₂SO₄ (1 M, 50µL/poço) e as absorbâncias serão determinadas em 450nm e 570 nm (TGF-β1). Os resultados serão obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões, e expressos em pg/mg de proteína.^{11,18,26}

8.10 Medida do Estresse Oxidativo por qRT-PCR em Tempo Real

A análise do mRNA de CAT, GPx, SOD, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), MMP-2 e β-actina será realizada por qRT-PCR. O RNA total será extraído com TRIzol (Invitrogen, USA), quantificado por espectrofotômetro (A260/280nm) e tratado com desoxiribonuclease para eliminar contaminação por DNA genômico. O cDNA será obtido através da transcrição reversa com kit comercial GoScript (Promega, USA) utilizando 1µg de RNA total. PCR quantitativo será feito utilizando SYBR Green para detectar a síntese de dupla-fita durante a reação. Ao final do protocolo, uma análise da curva de “melting” será inclusa. β-actina será utilizado como controle endógeno. Expressão relativa será determinada com 7500 e 7500 Fast Real-Time PCR Systems Software v.2.0.6 (Applied Biosystems). A eficiência por amostra será calculada usando LinReg PCR 2012.3 Software (<http://LinRegPCR.nl>). Os níveis da expressão relativa de mRNA será medida usando o método 2-DDCT.^{27,28}

8.11 Análise da Morfologia Tecidual

Cortes sagitais seriados serão obtidos de todo o pulmão esquerdo para análises histológicas e morfométricas com distribuição completa. Para a análise histológica do tecido pulmonar, as amostras dos pulmões esquerdos dos ratos com FP induzida e controles serão imediatamente fixadas em formalina tamponada 10%, incluídas em parafina e realizados cortes seriados de 4µm de espessura, abrangendo. Em seguida, serão empregados os métodos de coloração com hematoxilina-eosina e picrosirius para visualização de lesões fibróticas conforme estudos anteriores^{24,29,30}. Os graus de FP serão analisados em 18 campos (6 campos não sobrepostos em 3 cortes diferentes) por

profissional treinado em citologia, utilizando microscopia óptica, através do método modificado de escore de Ashcroft³¹, conforme quadro a seguir:

Grau	Padrão de lesão observado
0	Pulmão normal
1	Espessamento fibroso mínimo das paredes alveolares ou bronquiolares.
2-3	Espessamento moderado das paredes sem danos evidentes à arquitetura pulmonar.
4-5	Caracterizado por aumento da fibrose com dano definitivo à estrutura pulmonar e formação de bandas fibrosas ou pequenas massas fibrosas.
6-7	Distorção grave da estrutura e grandes áreas fibrosas.
8	Obliteração fibrosa total do campo pulmonar

8.12 Determinação de Peptídeos Plasmáticos

A quantificação das concentrações de peptídeos em amostras de plasma será realizada por metodologia adaptada. Para isso, alíquotas de 250 µL de plasma serão adicionadas de 750 µL de água deionizada e aplicadas a cartuchos de extração em fase sólida (SPE-C18, Strata-X, 30 mg/mL, Phenomenex, USA) sendo posteriormente eluídas com acetonitrila. A fração coletada será evaporada sob fluxo de nitrogênio e ressuspensa em 20 µL de solução contendo água e acetonitrila (4:1; v/v). Alíquotas de 10 µL da amostra purificada serão injetadas em um equipamento de LC-HRMS constituído por um cromatógrafo líquido Prominence UFLC (Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas binárias (LC-30AD), um forno para coluna (CTO-20A), um detector de absorvância de arranjo de diodos (SPD-M20A) e um injetor automático (SIL-20A). O sistema de LC é integrado ao analisador QTOF (do inglês, quadrupole-time-of-flight) em posição ortogonal e em série para alta resolução e precisão de massas, marca Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII. Os dados serão processados utilizando os softwares Data Analysis e HyStar™ (Bruker Corporation, Alemanha). Para a otimização do sistema cromatográfico, serão avaliados a composição e fluxo de fase móvel e temperatura do forno. Já a otimização do espectrômetro de massas será realizada a partir da análise da temperatura da fonte, energia do capilar, fluxo de nitrogênio, energia do quadrupolo, energia do hexapolo, energia de colisão e frequência de aquisição. As análises serão realizadas em modo positivo com o monitoramento dos íons multicarregados ($[M+2H]^{2+}$ ou $[M+3H]^{3+}$). O equipamento será calibrado diariamente com uma solução de formato de sódio (10 mM) com um erro de massas inferior a 5 ppm.³²

9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos serão comparados por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Além disso, como os animais terão sido submetidos ao cateterismo para medida da pressão no ventrículo direito e na artéria pulmonar, respectivamente, será utilizada a correlação de Pearson para verificar se existe associação desses parâmetros com os demais resultados. Os resultados serão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Valores de $P \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

10 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Ativ/Meses (jun 2021 a dezembro 2022)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
(A-1) Execução do projeto aprovado p/CEUA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(A-2) Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(A-3) Compra de material de consumo	X	X	X	X	X	X												
(A-4) Reuniões de Discussão sobre Projeto	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(A-5) Tratamentos dos animais		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
(A-6) Eutanásia e coleta de tecidos			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
(A-7) Execução técnicas de Western Blot						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
(A-8) Identificação de citocinas inflamatórias						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
(A-9) Determinação de peptídeos plasmáticos					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
(A-10) Análise da morfologia tecidual					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
(A-11) Análise dos resultados							X	X	X	X	X	X	X	X	X			
(A-12) Elaboração de Artigo Científico								X	X	X	X	X	X	X	X	X		
(A-13) Elaboração do Relatório científico					X	X					X	X				X	X	X
(A-14) Submissão de Artigo científico															X	X		
(A-15) Envio do Relatório Científico e Prestação de contas						X						X						X

11 RESULTADOS ESPERADOS

- a) Confirmar que há um desequilíbrio na relação entre a expressão dos peptídeos do sistema renina angiotensina, em ratos com Fibrose Pulmonar induzida por bleomicina, em favor do eixo fibrosante;
- b) Verificar que o tratamento com Alamandina reduz o perfil dos fatores pró-inflamatórios, e melhora o perfil oxidativo assim como a relação da expressão dos peptídeos do sistema renina angiotensina, em ratos com Fibrose Pulmonar induzida por sulfato de bleomicina, em favor do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Alamandina-MrgD;
- d) Avaliar os efeitos do tratamento com Alamandina sobre os parâmetros ventilatórios, hemodinâmicos, histológicos, bioquímicos e moleculares, analisados em pulmões de ratos que desenvolveram FP induzida por sulfato de bleomicina;

c) Contribuir com a literatura e direcionar novas pesquisas que visem alternativas terapêuticas para FP, melhorando a qualidade de vida de pacientes, reduzindo o número de internações, transplantes e dos custos para o Sistema Único de Saúde.

12- ORÇAMENTO

MATERIAIS DE CONSUMO	QTD	Valor un.		Valor total	
Agulha	300	R\$	0,40	R\$	120,00
Alamandina 25mg	1	R\$	2.025,00	R\$	2.025,00
Álcool Isopropílico 1L	1	R\$	50,00	R\$	50,00
Amplex Red-Catalase	1	R\$	1.778,32	R\$	1.778,32
Anestésico	5	R\$	50,00	R\$	250,00
Anticorpo Anti-Col 1 2mL	1	R\$	2.660,00	R\$	2.660,00
Anticorpo Anti-fibronectina 2mL	1	R\$	1.457,00	R\$	1.457,00
Anticorpo Anti- α SMA 2mL	1	R\$	2.001,00	R\$	2.001,00
Cateter periférico BD insyte	50	R\$	0,70	R\$	35,00
Clorofórmio 1L	1	R\$	100,00	R\$	100,00
Corante Azul de Trypan 100ml	1	R\$	150,00	R\$	150,00
Corante May-Grünwald-Giemsa 1L	1	R\$	527,00	R\$	527,00
Eosina 500mL	2	R\$	268,00	R\$	-536,00
Etanol absoluto 1L	1	R\$	20,00	R\$	-20,00
Filtro 0,22 μ m	250	R\$	8,00	R\$	2.000,00
GoScript Promega 100 reações	4	R\$	623,00	R\$	2.492,00
Hematoxilina 500mL	1	R\$	256,00	R\$	-256,00
Inflammation CBA Kit	1	R\$	4.490,00	R\$	4.490,00
Isoflurano 100mL	5	R\$	120,00	R\$	-600,00
Kit p/ PCR	4	R\$	300,00	R\$	1200,00
Kit SuperScript p/ RT-PCR	2	R\$	2.000,00	R\$	4.000,00
Kit TGF- β 1	1	R\$	4.000,00	R\$	4.000,00
Kit medida-AT1	3	R\$	2.000,00	R\$	6.000,00
Kit medidas-AT2	3	R\$	2.000,00	R\$	6.000,00
Kit medidas-Mas	4	R\$	2.000,00	R\$	8.000,00
Kit medida-MrgD	4	R\$	2.000,00	R\$	8.000,00
Kit medidas-Alamandina	4	R\$	2.000,00	R\$	8.000,00
Kit medidas-Ang 1-7	4	R\$	2.000,00	R\$	8.000,00
Kit medidas-AngII	4	R\$	2.000,00	R\$	8.000,00
Luvas de Procedimento cx 50 pares	10	R\$	25,00	R\$	-250,00
Marcador de Peso molecular	2	R\$	500,00	R\$	1.000,00
Microtubos p/ reação	10000	R\$	0,05	R\$	-500,00
Ponteiras	4000	R\$	0,10	R\$	-400,00
Primers	13	R\$	120,00	R\$	1.560,00
Reagente TRIzol 100mL	5	R\$	500,00	R\$	2.500,00
RNAse-out 125 μ L	4	R\$	150,00	R\$	-600,00
seringa 1mL	200	R\$	0,40	R\$	-120,00

Soro fetal bovino 1L	5	R\$	350,00	R\$	1.750,00
Sulfato de Bleomicina 15 UI	4	R\$	2.812,00	R\$	11.248,00
Tubo plástico cônico tipo falcon	150	R\$	4,00	R\$	600,00
Ratos Wistar	80	R\$	25,00	R\$	2.000,00
		total		R\$	99.275,32
MATERIAIS PERMANENTES	QTD	Valor un.		Valor total	
Botijão nitrogênio líquido	1	R\$ 6.000,00		R\$	6.000,00
Jogo de micropipetas	2	R\$ 5.000,00		R\$	10.000,00
Computador	4	R\$ 2.500,00		R\$	10.000,00
Espectrofotômetro	1	R\$ 5.000,00		R\$	5.000,00
		total		R\$	31.000,00

Total material permanente + material de consumo: 130.275,32

A maior parte do que será utilizado no presente projeto já temos em nosso laboratório. O material listado abaixo será solicitado através do Edital nº 04/2021/PROPPG - Programa de fomento para a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA

MATERIAIS DE CONSUMO	QTD	Valor un. (R\$)	Valor total (R\$)
Alamandina 25mg	1	2.025,00	2.025,00
ALZET Osmotic Pumps modelo nº2004	2	3.500,00	7.000,00
Anestésico	5	50,00	250,00
Total			9.275,00

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A. *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
2. Sipriani TS, dos Santos RAS and Rigatto K. The renin-angiotensin system: alamandine is reduced in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Cardiol Cardiovasc Med.* 2019; 4:210-215.
3. Raupp D, Fernandes RS, Antunes KH, Perin FA, Rigatto K. Impact os angiotensin II type1 and G-protein-coupled Mas receptor expression on the pulmonary performance of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Peptides.* 2020 (170384) 133:1-7.
4. Funke MG, T. Idiopathic pulmonary fibrosis: the turning point is now! *Swiss Med Wkly.* 2015;145: w14139.
5. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ and Fibrosis AEJACoIP. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183:788-824.
6. Eaton T, Young P, Milne D and Wells AU. Six-minute walk, maximal exercise tests: reproducibility in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005.
7. Dowman L, McDonald CF, Hill C, Lee A, Barker K, Boote C, Glaspole I, Goh N, Southcott A, Burge A, Ndongo R, Martin A and Holland AE. The benefits of exercise training in interstitial lung disease: protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMC Pulm Med.* 2013; 13:8.

8. Hrenak J, Paulis L and Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2016;17.
9. Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, Castellano RK, Ostrov DA, Oh SP, Katovich MJ and Raizada MK. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179:1048-54.
10. Murphy AM, Wong AL and Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2015; 8:7.
11. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK and Katovich MJ. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin- (1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H736-42.
12. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE and Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87:E1-9.
13. Uhal BD, Li X, Piasecki CC and Molina-Molina M. Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44:465-8.
14. Villela DC, Passos-Silva DG and Santos RA. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014; 23:130-4.
15. Li X, Molina-Molina M, Abdul-Hafez A, Ramirez J, Serrano-Mollar A, Xaubet A and Uhal BD. Extravascular sources of lung angiotensin peptide synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291:L887-95.
16. Königshoff M, Jahn A, Sedding D, Amarie OA, Eul B, Seeger W, Fink L, Günther A, Eickelberg O, Rose F. The angiotensin II receptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007.
17. Uhal BD, Kim JK, Li X and Molina-Molina M. Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. *Curr Pharm Des.* 2007;13:1247-56.
18. Abdul-Hafez A, Uhal BD. JunD and HIF-1 α mediate transcriptional activation of angiotensinogen by TGF- β 1 in human lung fibroblasts. *FASEB J.* 2009.
19. Hussain A, Wang K, Bhandaru M, Biswas R, Avram D, Föller M, Rexhepaj R, Friedrich B, Ullrich S, Müller G, Kuhl D, Risler T, Lang F. SGK1-dependent upregulation of connective tissue growth factor by angiotensin II. *Kidney Blood Press Res.* 2008.
20. Afonso Junior JE, Werebe Ede C, Carraro RM, Teixeira RH, Fernandes LM, Abdalla LG, Samano MN and Pego-Fernandes PM. Lung transplantation. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13:297-304.
21. Barbayanni I, Ninou L, Tzouveleakis A, and Aidinis V. Bleomycin revisited: a direct comparison of the intratracheal micro-spraying and the oropharyngeal aspiration routes of bleomycin administration in mice. *Frontiers in Medicine.* 2018 (5) 269: 1-6.
22. Carrington R, Jordan S, Pitchford SC and Page CP. Use of animal models in IPF research. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2018 (51): 73-78.
23. Jenkins R, Gisli Jenkins, Bethany B. Moore, Rachel C. Chambers, Oliver Eickelberg, Königshoff M, Kolb M, Laurent GL, Nanthakumar CB, Oltman MA, Pardo A, Selman M, Sheppard D, Sime PJ, Tager AM, Tatler AL, Thannickal V and White ES; on behalf of the ATS Assembly on Respiratory Cell and Molecular Biology. Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (56- Iss 5): 667–679, 2017.
24. Schiller HB, Fernandez IE, Burgstaller G, Schaab C, Scheltema RA, Schwarzmayr T, Strom TM, Eickelberg O, Mann M. Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Mol Syst Biol* 2015;11:819.
25. Oldim JR, M. P. Pesquisa em Saúde e os Direitos dos Animais. Porto Alegre: HCPA; 2009.
26. Renzoni EA, Abraham DJ, Howat S, Shi-Wen X, Sestini P, Bou-Gharios G, Wells AU, Veeraraghavan S, Nicholson AG, Denton CP, Leask A, Pearson JD, Black CM, Welsh KI and du Bois RM. Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts. *Respir Res.* 2004;5:24.
27. Santos-Silva MA, Pires KM, Trajano ET, Martins V, Nesi RT, Benjamin CF, Caetano MS, Sternberg C, Machado MN, Zin WA, Valenca SS and Porto LC. Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice. *Toxicol Pathol.* 2012;40:731-41.

28. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI and Oliveira EM. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme- angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011;58:182-9.
29. Xiaolin Yu, Yanxia Zhang , Xiaohua Yang, Xiaomei Zhang, Xinxiang Wang, Xuemei Liu, and Yan Yan. The Influence of BuqiHuoxueTongluo Formula on Histopathology and Pulmonary Function Test in Bleomycin-Induced Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Rats. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018. 1-13
30. Phan SH VJ, Smith D. Rat lung fibroblast collagen metabolism in bleomycin induced pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76 (1).
31. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988. 41:467–470.
32. Quaisar Ali, Yonnie Wu, Sourashish Nag and Tahir Hussain. Estimation of angiotensin peptides in biological samples by LC–MS method. *Anal. Methods*. 2014, 6, 215–222.
33. Lijie Cui, Kasem Nithipatikom, William B. Campbell. Simultaneous analysis of angiotensin peptides by LC–MS and LC–MS/MS: Metabolism by bovine adrenal endothelial cells. *Anal. Biochem*. 369 (2007) 27–33.
34. Waynforth HBF, P. A. Experimental and surgical technique in the rat. 2nd. London: Academic Press; 1992.

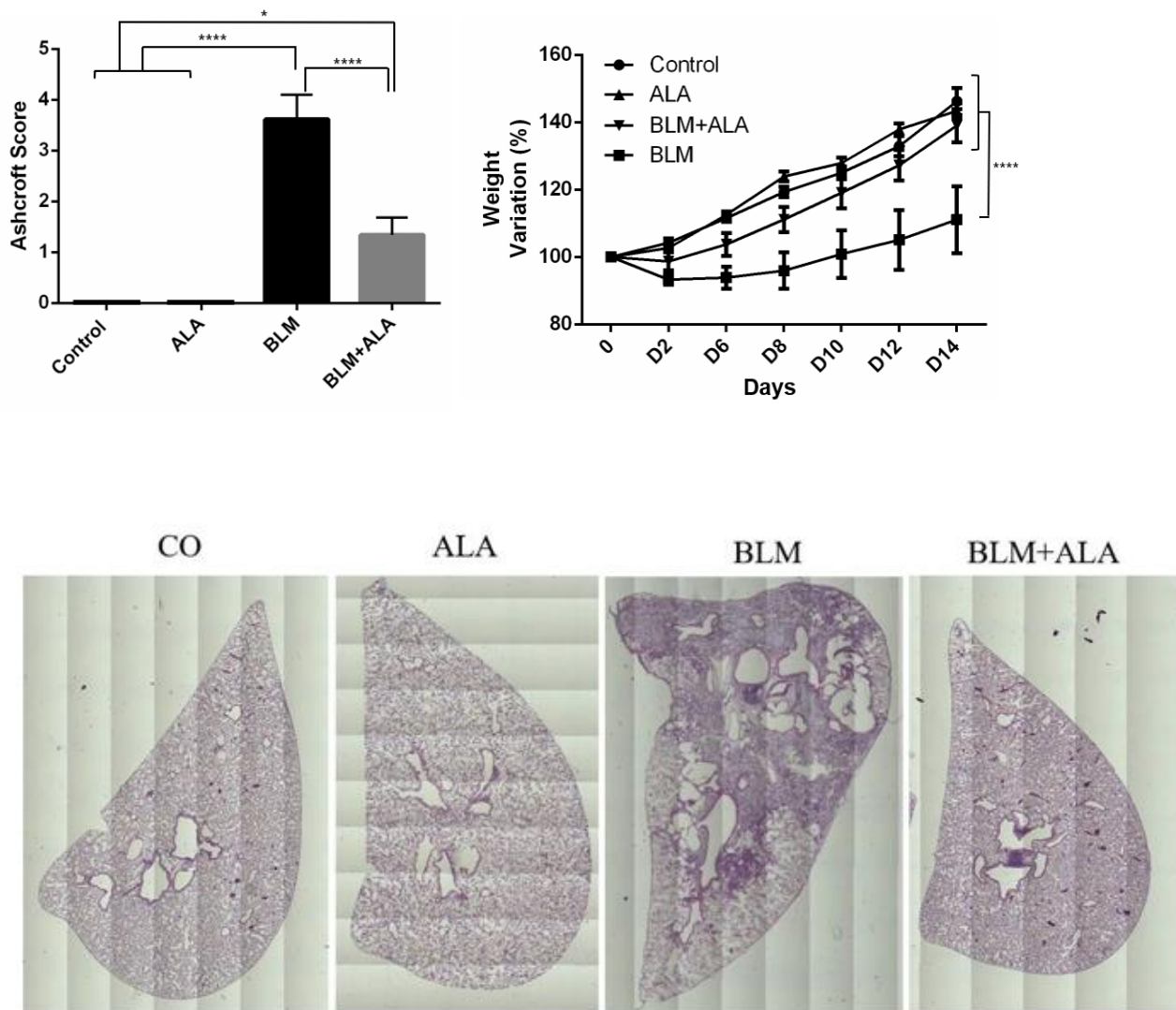
Cah

Moller

Yu,

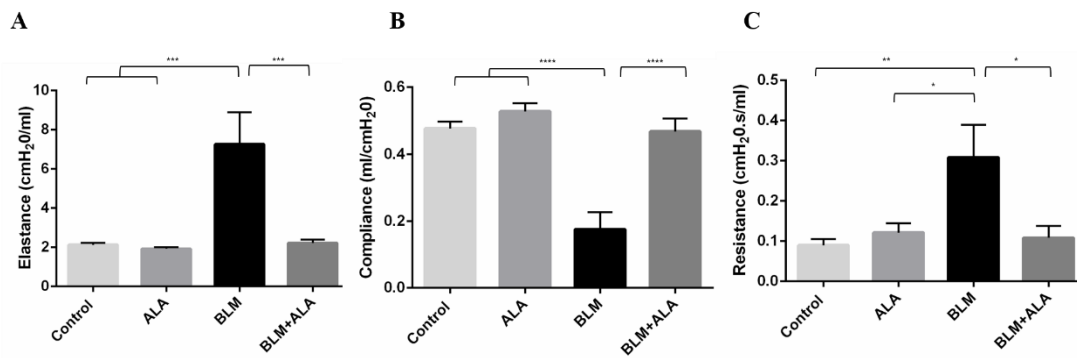
ANEXO I

Figure 1: Effect of alamandine on the development of pulmonary fibrosis. Panel A: Body weight variation (%) analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison post-test; Panel B: Fibrosis degree according to Ashcroft modified score ($F=33.10$) and collagen deposition in the lungs; Panel C: Representative images of effects at 2 weeks after alamandine treatment on histological findings and collagen deposition in the lungs. Hematoxylin and eosin (HE) and Masson trichrome (MT) staining; 40x. Tissue changes were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post-test. All data represent mean $\pm$ SEM; $n=7$; $P<0.05$ was considered statistically significant. * $P<0.05$; **** $P<0.0001$.



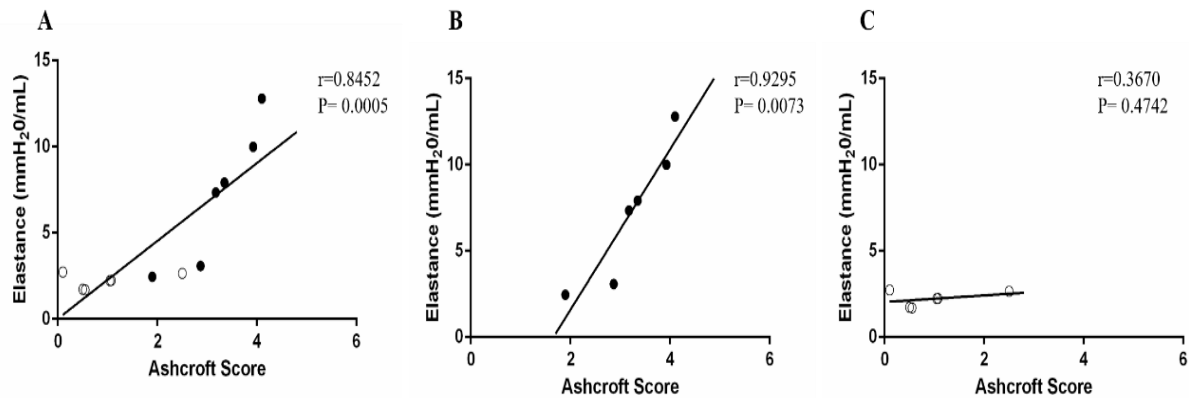
ANEXO II

Legend to Figure 2. Lung mechanics on days 14. Panel A: Elastance=elastic rigidity, $F=11.28$; Panel B: Compliance=ease of extension, $F=20.50$; Panel C: Resistance=level of constriction, $F=5.31$. Control=animals that received only saline; ALA=saline intratracheally and alamandine in the osmotic minipumps; BLM=bleomycin intratracheally and saline in the osmotic minipumps; BLM+ALA=bleomycin intratracheally and alamandine in the osmotic minipumps. One-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test was used. Data represent mean $\pm$ SEM; $n=6-7$; $P<0.05$ was considered statistically significant. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p=0.0001$; **** $p<0.0001$.

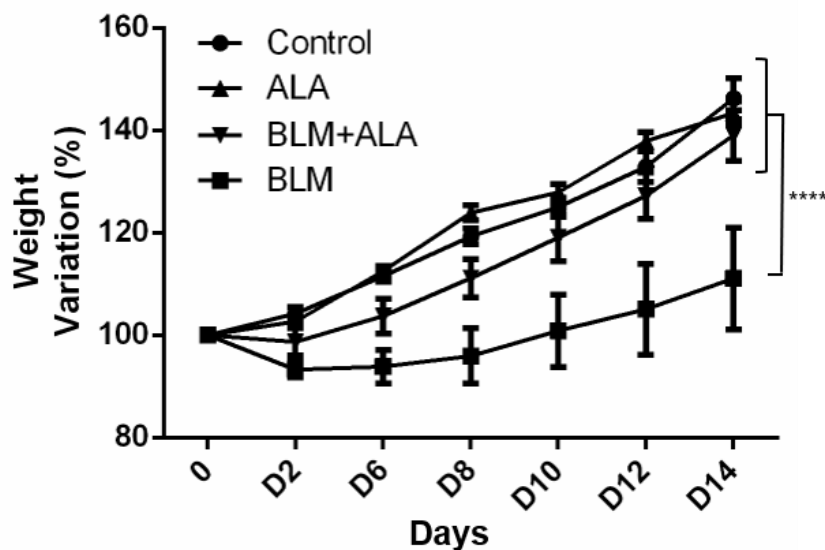


ANEXO III

Figure 3: Association between Ashcroft Score and pulmonary elastance. Panel A: BLM and BLM+ALA groups ($R^2=0,7143$); Panel B: BLM group ($R^2=0.8640$); Panel C: BLM+ALA group ($R^2=0.1347$). Control=animals that received only saline; ALA=saline intratracheally and alamandine in the osmotic minipumps; BLM=bleomycin intratracheally and saline in the osmotic minipumps; BLM+ALA=bleomycin intratracheally and alamandine in the osmotic minipumps. (n=6). ●=BLM group ○=BLM+ALA group



Body weight variation from the beginning (day 0) to the end of the experiments (day 14):



ANEXO IV

Table 1 - Sample characterization and Pulmonary Function Test

Variables	Control (n=6)	Fibrosis (n=6)	P
Age (years)	55.7 ± 14.1	54 ± 12.7	0.83
Gender (male)	3	5	
Weight (kg)	79.8 ± 20.57	72.5 ± 8.94	0.67
Height (m)	1.69 ± 0.12	1.72 ± 0.13	0.34
BMI (kg/m ²)	27.54 ± 3.86	24.7 ± 2.93	0.6
Previous smoking	2	3	0.6
FEV ₁ %	81.9 ± 14.5	46.5 ± 18.43	0.0041*
FVC%	86.3 ± 13	43.83 ± 16.9	0.0006**
FEV ₁ /FVC%	75.18 ± 6.36	70 ± 35.7	0.13

BMI=body mass index; kg=kilogram; m=meter; FEV₁=forced expiratory volume in the first second; FVC=forced vital capacity; %=Percentage. The data are presented as mean±SD.

(A)

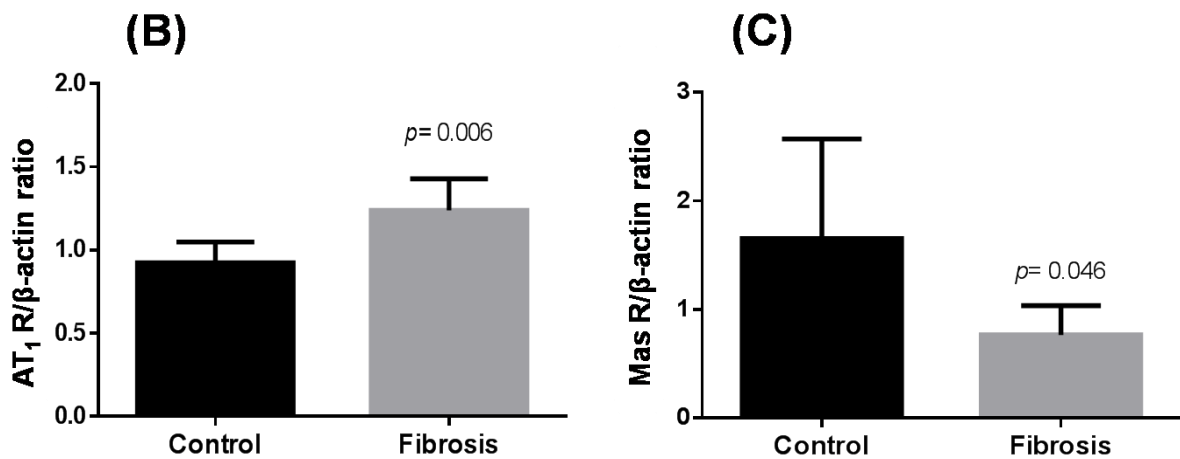
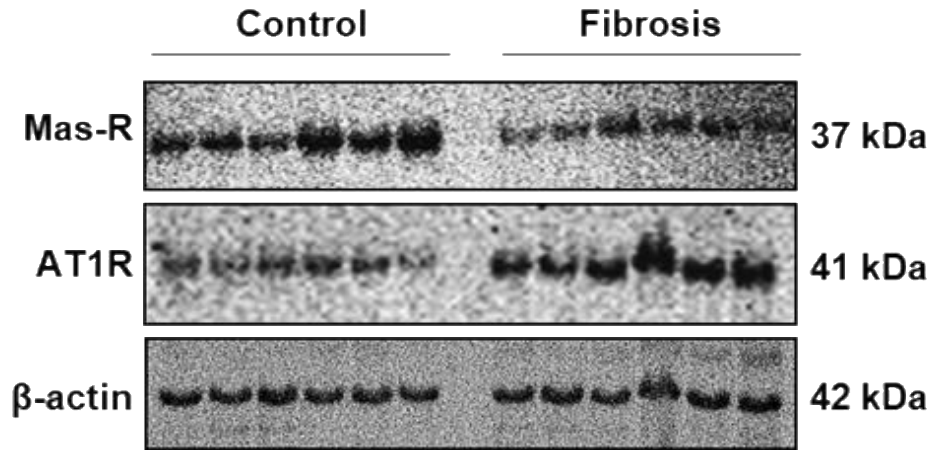


Figure 1 - Protein expression of AT1 and Mas receptors in lung tissue (n=12). A: Expression of AT1 and Mas receptors in idiopathic pulmonary fibrosis lung tissue and control evaluated by western blot. B: Protein quantification of AT1 receptor in idiopathic pulmonary fibrosis and control lung tissue. C: Protein quantification of Mas receptor in idiopathic pulmonary fibrosis and control lung tissue.

ANEXO VI

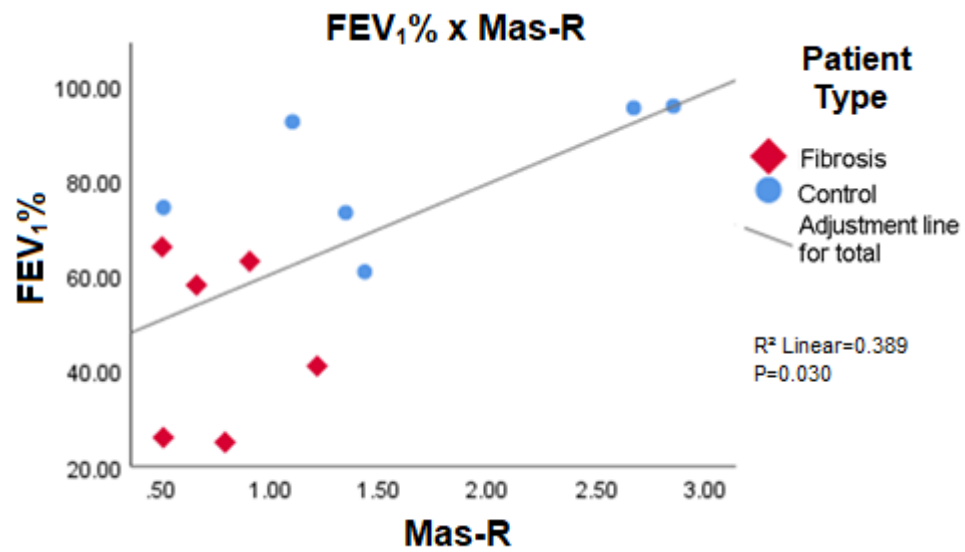


Figure 2 - Scatter plots of correlation analysis between spirometry values and Mas receptor quantification (n=12). FEV₁=forced expiratory volume in the first second; FVC=forced vital capacity.

ANEXO VII

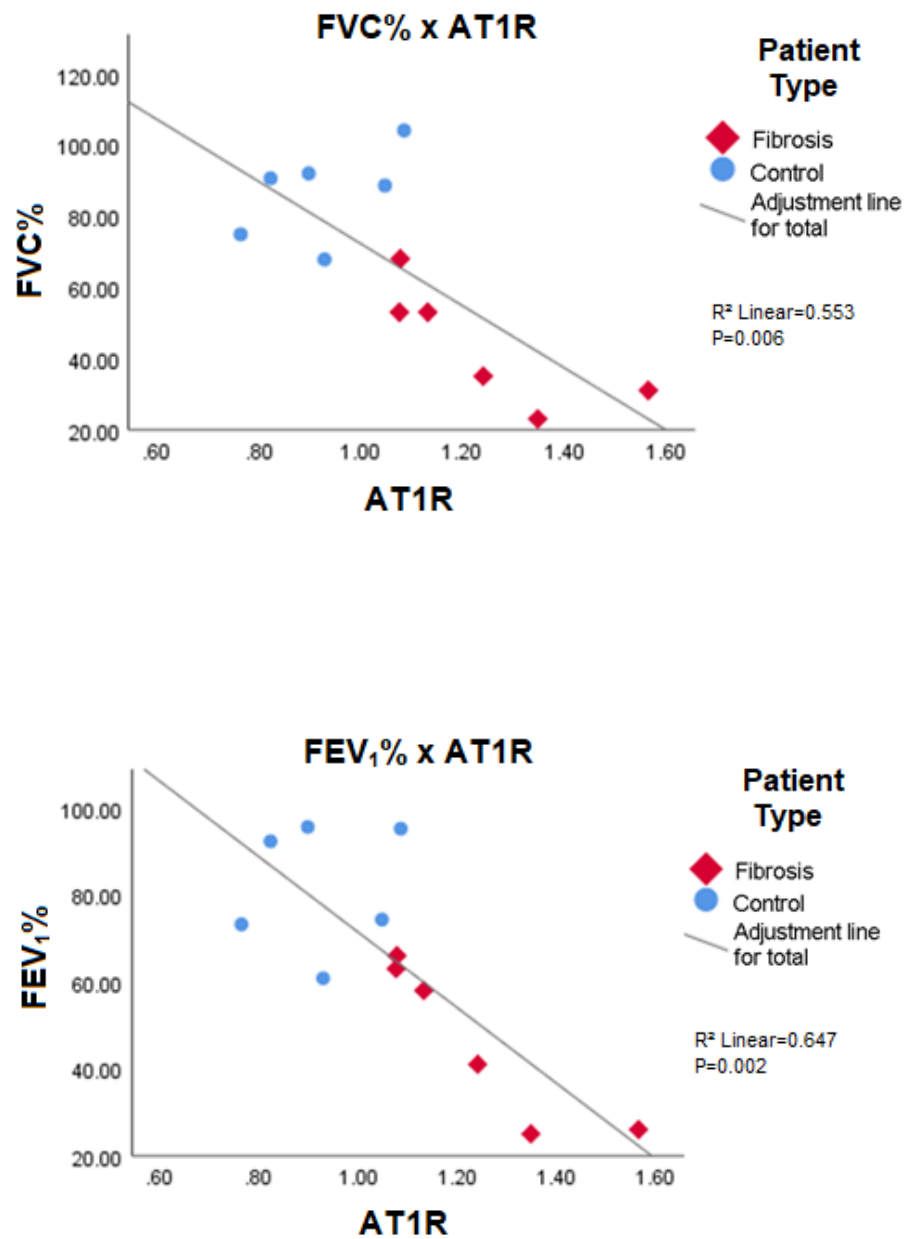


Figure 3 - Scatter plots of correlation analysis between spirometry values and AT1 receptor quantification (n=12). FEV₁=forced expiratory volume in the first second; FVC=forced vital capacity.

IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA:

Título: Caracterização de linfócitos T residentes de memória em infecções pulmonares virais de pacientes hospitalizados

Instituição executora: Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Instituição co-partícipe : Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Coordenador: Dr. Luiz Carlos Rodrigues Junior

Demais membros da equipe:

Médico Cristiano Amaral De Leon

Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Profa. Dra. Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

Fisioterapeuta Claudia Franceschetti

Fisioterapeuta Marcia Cristina Rover

Fisioterapeuta Camila Ramos Danielli

Médico Dr. Jorge Amilton Höher

Doutorando Gabriel Tardin Mota Hilario

Doutoranda Paula Coelho Teixeira

Mestranda Maria Eduarda Günther Oliveira Drumm

Mestrando Alisson Felipe Haubert

Resumo

Os vírus respiratórios, como o influenza vírus e o coronavírus, demonstraram nas últimas duas décadas potencial para ocasionar epidemias e pandemias. A forma mais efetiva de mitigar infecções virais é a vacinação da população, nesse mecanismo de proteção as células do sistema imunológico desempenham um importante papel. O sistema imunológico pode ser dividido em duas partes, de acordo com o momento de encontro com um patógeno, sistema imune inato e sistema imune adaptativo. Na resposta imune adaptativa, podem ser formadas células de memória, que são responsáveis por respostas mais rápidas e eficientes nas reinfecções pelo patógeno cognato. Os linfócitos T de memória são classificados em subpopulações, denominadas de linfócitos de memória efetora, linfócitos de memória central, e os linfócitos de memória residentes de tecido. Os linfócitos T residentes de memória foram identificados e descritos na última década, essas células residem no sítio primário de infecção, somando-se a barreira de proteção. Desta forma, nos casos de infecção essas células são responsáveis por orquestrar uma rápida resposta imunológica contra o patógeno. Estudos recentes em camundongos vêm demonstrando que os linfócitos T residentes são uma importante chave para a formulação de vacinas e desenvolvimento de imunoterapias. Indivíduos com comprometimento pulmonar por infecções causadas por vírus respiratórios apresentam diferentes desfechos clínicos, que se relacionam com a idade, imunizações, comorbidades, tipo de vírus envolvido na infecção e tratamento. Dada a importância biológica e o impacto clínico dos linfócitos T residentes de memória, é essencial a investigação das funções celulares em infecções pulmonares virais humanas. Neste contexto, esse estudo pretende avaliar a população de linfócitos T CD8 residentes de memória presentes em secreção pulmonar de pacientes infectados por vírus respiratórios em estado grave, internados em unidade de tratamento intensivo. O objetivo

é correlacionar o número de função dessas células com outras subpopulações celulares do paciente, assim como outros parâmetros clínicos-laboratoriais. Ao final do projeto, traçaremos um perfil biológico dos linfócitos T residentes e memória de acordo com diferentes infecções virais pulmonares e desfechos clínicos observados.

1- Introdução

As duas últimas décadas demonstraram que os vírus respiratórios, notadamente os vírus RNA – influenza vírus e coronavírus, apresentam grande capacidade de mutação em hospedeiros susceptíveis, ocasionando epidemias e pandemias - H1N1 ou gripe A (2009-2010) e COVID-19. As formas mais efetivas de mitigar este tipo de infecção são o isolamento social, a lavagem das mãos e a vacinação (1), posto que não há tratamento efetivo específico para a maioria dos vírus, apenas para os sintomas clínicos da infecção. Ao mutar e gerar novas proteínas, o vírus respiratório enfraquece a imunidade mediada por anticorpos e células específicas, geradas em uma vacinação prévia, diminuindo a sua eficiência neutralizante (2).

Na resposta imune antiviral, não somente os anticorpos são importantes, mas as células desempenham uma função significativa, como os macrófagos, os linfócitos B e os linfócitos T. O sistema imunológico é formado em dois momentos, considerando o tempo e a especificidade, principalmente. O primeiro momento é caracterizado pela resposta imune inata, na qual células da linhagem mielóide como monócitos/macrófagos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos podem atuar para a proteção do hospedeiro. No segundo momento, caracterizado pela resposta imune adaptativa, participam os linfócitos T e B, e cooperação com as células mieloides (3).

A imunidade adaptativa pode ser subdividida em fase efetora e de memória, nessa imunidade participam os linfócitos T *helper* (Th) e T citotóxicos. Os linfócitos Th funcionam modulando as respostas de

linfócitos B, linfócitos citotóxicos e células da linhagem mielóide, por meio de citocinas e quimiocinas, já os linfócitos T citotóxicos destroem células tumorais ou infectadas por microrganismos celulares, como o vírus (3). Após a resposta efetora, ocorre a formação das células de memória específicas, que permanecem no hospedeiro por longos períodos, proporcionando uma resposta rápida e efetiva em um encontro subsequente com o patógeno gerador da resposta (3).

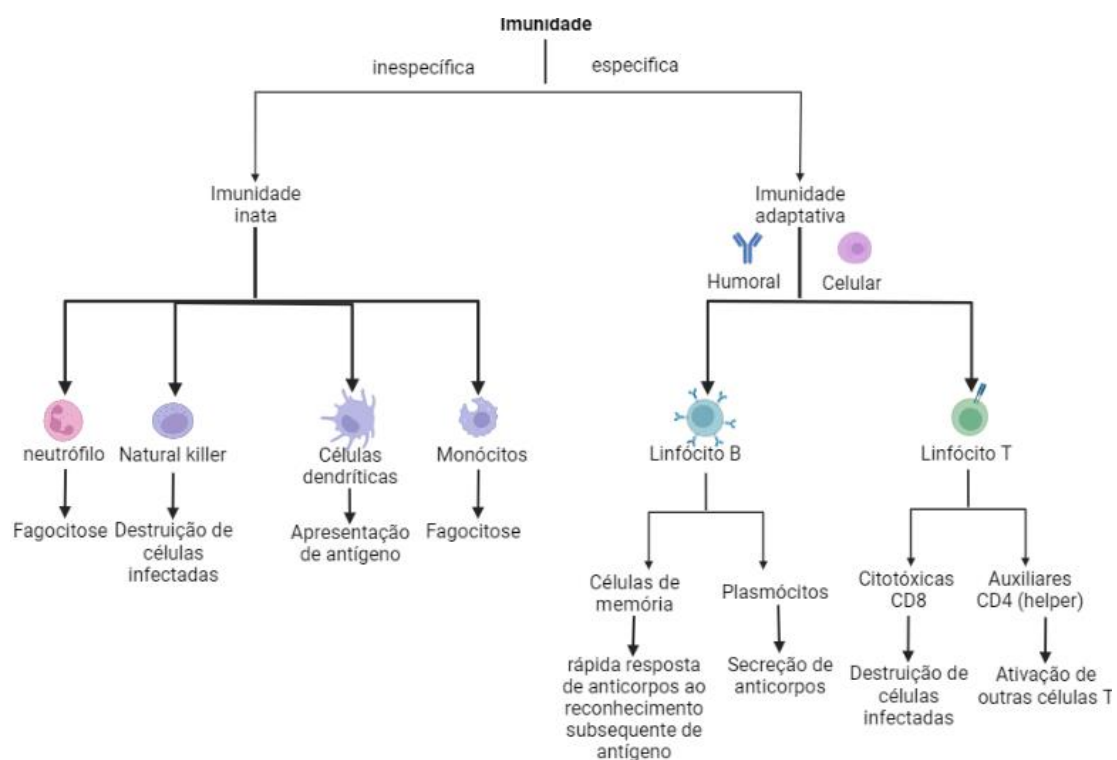


Figura 1: Organização esquemática do sistema imune e células que funcionam da resposta inata e adaptativa (imagem dos próprios autores).

As células de memória já foram descritas em diferentes tecidos como os órgãos linfóides secundários, mucosas e tecidos de barreira, mostrando a sobrevivência dessas células por longos períodos (4,5). Os linfócitos de memória são classificados de acordo com a sua localização e função especializada. Os subtipos de linfócitos são classificados em linfócitos de memória efetora (TEM), central (TCM) e residentes de tecido (T_{RM})(6). Os linfócitos TCM são encontrados em órgãos linfóides, realizando mecanismos efetores nesses locais. Os linfócitos TEM circulam entre tecidos e sangue, modulando respostas imunes sistêmicas

(7). Na última década uma nova subpopulação de linfócitos T, anteriormente classificada dentro dos linfócitos efetores quando estes estavam nos tecidos, foi identificada e denominada de linfócitos TRMs (8 – 13). Os TRMs atuam como sentinelas dos tecidos, modulando respostas de ataque direto a patógenos em momentos de reinfecção (5,14, 15).

As células CD4 e CD8 TRMs podem ser diferenciadas das outras células de memória pelo seu fenótipo, caracterizado pelos marcadores canônicos CD69, marcador de retenção no tecido, e a integrina CD103 para subconjuntos de CD8 TRM. Os TRMs apresentam um perfil de fatores de transcrição diferente das outras células de memória (16). Após a sua ativação e no momento da diferenciação, os linfócitos expressarão diferentes fatores de transcrição. Eles são gerados por fatores transcrpcionais (FT), e cada tipo de tecido produz um FT diferente, como o Hobit e Blimp (17), ou o FT Runx3 que aumenta o número de linfócitos CD4 TRM intraepitelial (18). Desta forma, cada tecido induz a formação de TRMs com algumas características distintas (5). A maior parte do entendimento atual sobre a diferenciação, manutenção e função dos TRMs decorre de estudos *in vivo* em modelos de infecção em camundongos (19-22). Estudos de infecção pulmonar em camundongos mostraram que os linfócitos TRM CD8 e linfócitos TRM CD4 possuem uma organização estratégica no tecido. O Linfócito TRM CD8 permanece localizado em nichos específicos de regeneração tecidual após lesão pulmonar (denominados depósitos de memória associados ao reparo), enquanto os linfócitos T CD4 com fenótipo TRM localizam-se nas vias aéreas ou ao redor de folículos de células B. Esses estudos em camundongos sugerem que o nicho do tecido pulmonar é um local distinto e altamente dinâmico para a geração de TRM, embora se desconheça se esse aspecto do ambiente pulmonar em humanos apresenta o mesmo tipo de organização (23).

Devido à sua localização tecidual, estes linfócitos são capazes de reconhecer imediatamente as células infectadas ou seus antígenos cognatos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos,

desencadeando uma cascata de funções efetoras pró-inflamatórias *in situ* (24). Os TRM também são capazes de ativação via “Bystander” contra antígeno inespecífico, revelando que os TRM gerados por infecções anteriores podem desempenhar importante papel em novas infecções, mesmo que por patógeno diferente do gerador da resposta (25). Em modelos animais de infecção por vírus na mucosa, as células T CD8 residentes em tecidos específicos do vírus atuam como uma primeira camada de proteção. Eles reconhecem as células infectadas pelo vírus e ativam a imunidade inata e adaptativa (26). Na infecção por vírus respiratórios, como influenza ou vírus sincicial respiratório, a presença ou a transferência adotiva de células T CD8 residentes em tecido na cavidade nasal foram capazes de controlar a disseminação viral e a gravidade da doença (27).

Estudos recentes em humanos vêm demonstrando, por análise do repertório de TCR de células T isoladas das vias aéreas superiores de indivíduos infectados por SARS-CoV-2, uma persistência de células T CD8 TRM específicas para a proteína Spike na cavidade nasal em tempo menor do que 2 meses após a infecção (28) e que células T específicas para peptídeos SARS-CoV-2, provavelmente induzidas por coronavírus sazonais, também foram detectadas no lavado broncoalveolar (LBA) (29). Novos estudos em humanos também relataram a presença de uma frequência muito alta de células T específicas para a proteína Spike ($\leq 10-20\%$ do total de células T nasais) nas vias aéreas de indivíduos vacinados com mRNA (30), outros detectaram células T específicas de proteína Spike apenas no LBA de convalescentes infectados com SARS-CoV-2 e não no LBA de indivíduos apenas vacinados (31). Assim, células TRM específicas foram identificadas em secreções pulmonares em humanos, mas pouco ainda se sabe sobre sua dinâmica e comportamento em infecção por diferentes vírus e seu impacto na resolução da infecção.

Em estudos anteriores, nossa equipe avaliou a diferença nas respostas imunes celulares e humorais sistêmicas de pacientes pediátricos e adultos com COVID-19. O perfil imunológico não específico

das crianças é dominado por linfócitos virgens e células dendríticas (DC) HLA-DR^{high}CX3CR1^{low}, que são um perfil de DCs funcionais que têm a capacidade de estimular células T virgens. Enquanto a população pediátrica demonstra fortes respostas específicas de anticorpos e células T às proteínas estruturais virais, com suas respostas de células T diferindo dos adultos por terem respostas mais fracas de células T CD8⁺TNF⁺ ao pool de peptídeos S, mas respostas mais fortes aos pools de peptídeos N e M (32). Contudo, esse estudo tem um olhar sistêmico sobre a resposta imune, como os biomarcadores no sangue periférico só são úteis quando altamente correlacionados com os resultados, estudar o perfil imunológico e memória no tecido pode ser esclarecedor quanto a dinâmica da resposta imune.

Indivíduos com comprometimento pulmonar por infecções causadas por vírus respiratórios apresentam diferentes desfechos clínicos, que se relacionam com a idade, imunizações, comorbidades e tipo de vírus envolvido na infecção. Hoje sabe-se que parâmetros imunológicos são importantes e influenciam no desfecho de infecções virais. Não existem estudos suficientes para a caracterização do papel das TRMs nas infecções pulmonares virais. Assim, é de extrema relevância científica e para a otimização de protocolos e manejos clínicos, produção de vacinas, o entendimento das dinâmicas das células TRMs em diferentes infecções pulmonares associadas a vírus.

Dada a importância biológica e impacto clínico dos TRMs, é essencial a investigação da função dessas células em infecções pulmonares virais humanas. No entanto, o sangue é o principal tecido utilizado em análises imunológicas, devido sua representatividade orgânica, facilidade de obtenção e manipulação laboratorial. Entretanto para estudos de TRMs é necessária a obtenção de amostras de tecidos sólidos ou secreções oriundas desses tecidos, como o lavado broncoalveolar (LBA) e o aspirado traqueal (AT).

1.1 Hipóteses da proposta:

- 1- Existe uma correlação entre o número e função de linfócitos TRM pulmonares, o tipo de infecção viral e a evolução clínica do paciente.
- 2- A quantidade de linfócitos TRM apresenta correlação com a vacinação prévia do paciente para vírus respiratórios os quais existem vacinas disponíveis.
- 3- Existe uma correlação entre o número e função dos linfócitos TRM, a evolução clínica, faixa etária e a vacinação prévia do paciente.

1.2 Objetivo geral: Caracterizar os linfócitos T CD8 com fenótipo TRM presentes em aspirado traqueal, e relacionar estas com outros grupos de células do sistema imunológico, local e sistêmico, perfil vacinal, e evolução clínica de pacientes infectados por vírus respiratórios e internados em unidade de tratamento intensivo.

1.3 Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo experimental para o isolamento e quantificação de linfócitos TRMs em amostras de trato respiratório inferior humano.
- Determinar se existe diferença no número e função de linfócitos T CD8 com fenótipo de TRMs em diferentes infecções pulmonares de paciente em quadros severos (vírus, bactérias e fungos), assim como acompanhar a evolução dessas células.
- Estabelecer uma correlação entre o número e função das TRMs com idade, comorbidade, perfil bioquímico, hematológico do sangue e histórico vacinal dos pacientes.

- Estabelecer uma relação entre o número e função de linfócitos TRM pulmonares e outras células do sistema imune (linfócitos T CD4, monócitos, macrófagos e células dendríticas) no curso da infecção.

2- Metodologia proposta

2.1- Local de realização e delineamento do estudo

O Projeto de pesquisa é do tipo caso-controle, prospectivo no qual participarão pacientes com infecção pulmonar grave internados em unidades de terapia intensiva UTI. A coleta será realizada na UTI Adulto do Hospital Santa Clara e UTI pediátrica do Hospital da Criança Santo Antônio da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e na UTI Adulto e pediátrica do Hospital Universitário de Canoas. As análises laboratoriais serão realizadas nos laboratórios de imunovirologia da UFCSPA e imunoterapia da UFCSPA, ambos com nível de biossegurança adequado para a realização dos experimentos.

2.2 - População e amostra do estudo

Serão selecionados e recrutados pacientes com infecção pulmonar grave em unidades de terapia intensiva (UTI). Estes pacientes serão pareados por idade e sexo. Os pacientes em UTI serão alocados nos seguintes grupos: Diagnóstico de infecção pulmonar viral (não-COVID), pacientes com diagnóstico de infecção pulmonar por COVID, pacientes com infecção pulmonar de etiologia bacteriana ou fungica , e um quarto grupo pacientes hospitalizados em UTI com problemas pulmonares não relacionados à infecção viral ou bacteriana. As amostras de aspirado traqueal serão coletadas junto ao processo de aspiração que faz parte da rotina assistencial realizada nesses pacientes, pela equipe de fisioterapia da própria UTI. Os representantes legais dos participantes da pesquisa, após esclarecimento, e que aceitarem que o paciente que ele representa participe do estudo, assinará o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), um redigido para pacientes adultos e outro para

paciente infantil. Os pacientes serão todos recrutados nos Hospitais Santa Clara e Hospital da Criança Santo Antônio da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) e no Hospital Universitário de Canoas. Para acompanhamento da evolução dessas células, caso o paciente continue em intubação e autorizado no TCLE, serão analisadas células amostras de três coletas de aspirado traqueal. Primeira coleta entre o primeiro e terceiro dia de internação, segunda coleta entre o sétimo e oitavo dia de internação e terceira coleta entre o décimo segundo e decimo quinto dia de internação.

O Hospital Santa Clara conta com 20 leitos de intensivismo, onde internam pacientes acima dos 18 anos de idade. Apresenta como escore de gravidade da unidade o APACHE II (Anexo 1) (33). As doenças mais prevalentes que ocorrem na unidade são insuficiência respiratória, choque séptico e pós-operatórios. O nível de complexidade é avançado 3 e o coordenador é o Médico Jorge Hoer.

O Hospital da Criança Santo Antônio conta com 50 leitos de UTI pediátrica, onde internam pacientes de 1 mês a 17 anos incompletos. Apresenta na rotina assistencial para classificação de Gravidade o Escore PIM II (*Pediatric index of mortality 2*) (Anexo 2) (34). As doenças mais prevalentes que ocorrem na Unidade são doenças infecciosas virais e bacterianas, cirurgias cardíacas, pacientes oncológicos e transplantados. O nível de complexidade da Unidade é avançado tipo 3. A coordenadora é a Médica Claudia Pires Ricachinewsky

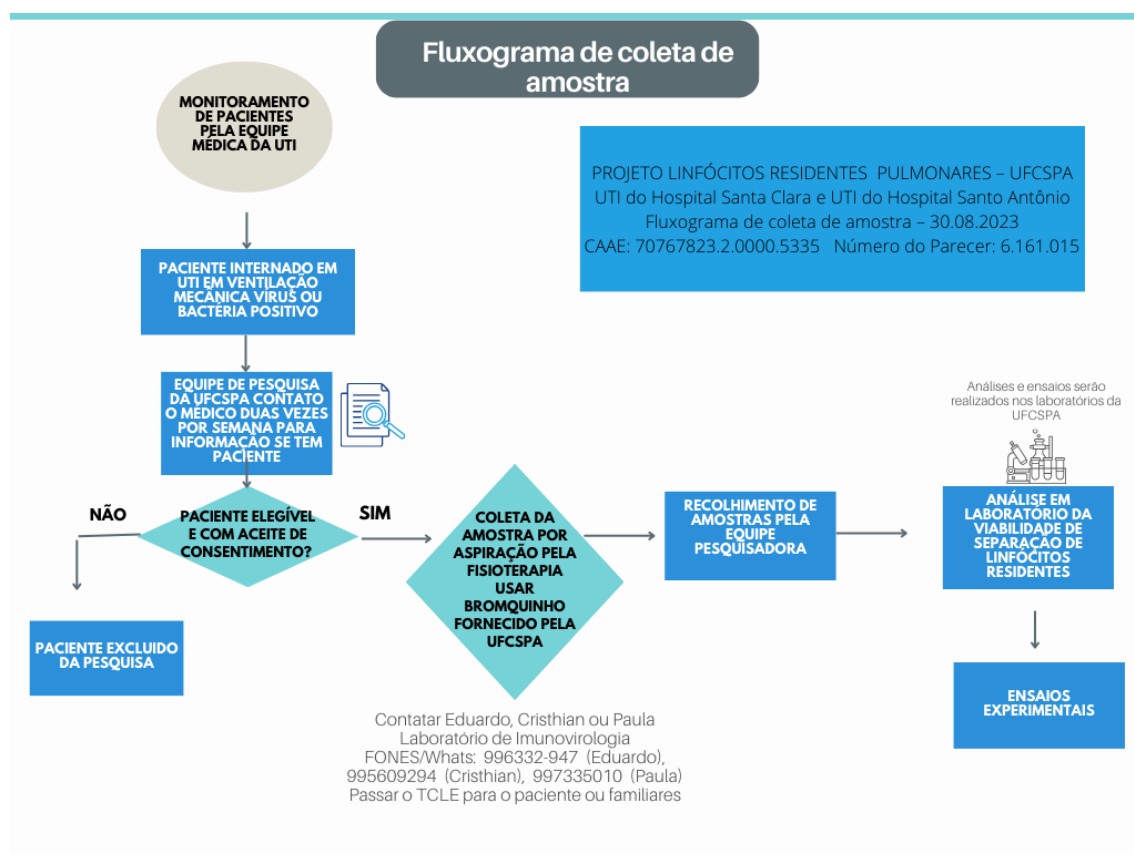
O Hospital Universitário de Canoas conta com UTI adulto e Pediátrico. A Unidade adulto conta com 40 leitos de terapia intensiva, onde internam pacientes a partir de 17 anos. Apresenta na rotina assistencial para classificação de Gravidade o Escore SAPS III (35) (*Simplified Acute Physiology Score*) Anexo 3. As doenças mais prevalentes que ocorrem na Unidade são doenças infecciosas virais e bacterianas, cirurgias cardíacas e doenças cardiovasculares (Acidente Vascular Cerebral e Infarto Agudo do Miocárdio). O nível de complexidade da Unidade é avançado tipo 2 (30 leitos) e tipo 3 (10 leitos). O Coordenador é Médico Andre Willani. A Unidade pediátrica conta com 10 leitos de

terapia intensiva, onde internam pacientes a partir de 1 mês de idade até 14 anos incompletos. Apresenta na rotina assistencial para classificação de Gravidade o Escore PIM II (35) (*Pediatric index of mortality 2*) – Anexo 2. As doenças mais prevalentes que ocorrem na Unidade são doenças infecciosas virais e bacterianas, Asma, pós-operatórios de cirurgia pediátrica. O nível de complexidade da Unidade é 3 e a Coordenadora é a Médica Luciane Gomes da Cunha.

Os responsáveis pelos pacientes serão informados sobre os procedimentos a serem realizados, incluindo as coletas de material biológico e somente serão incluídos no estudo após assinatura de termo de consentimento. A partir da assinatura o paciente será denominado participante da pesquisa. O médico assistente, responsável pelo paciente participante de pesquisa, autorizará o investigador o acesso às amostras de aspirado traqueal e sangue, somente após enquadrar-se nos critérios de elegibilidade, a assinatura do TCLE. As amostras serão entregues aos pesquisadores pela equipe de Fisioterapia quando for aspirado traqueal, e de Enfermagem, quando for sangue.

O fluxo para obtenção das amostras será conduzido da seguinte maneira: Os membros da equipe médica irão monitorar a admissão dos pacientes nas UTIs e informarão a equipe de pesquisa quando pacientes com o perfil desejado estiverem disponíveis. Uma vez notificados, um membro da equipe de pesquisa, previamente treinado, conversará com o responsável pelo paciente potencial participante da pesquisa, para explicar de forma simples os detalhes do estudo. Caso ele entenda e concorde, ele assinará o TCLE. Uma via documento ficará com o responsável e outra com os pesquisadores.

Com o termo de consentimento assinado, a equipe de pesquisa se comunicará com a equipe de fisioterapia e/ou enfermagem para agendar a coleta das amostras, seguindo a rotina hospitalar estabelecida. A metodologia de coleta de amostras será detalhada a seguir, sendo a mesma utilizada na prática habitual do hospital.



2.3 Cálculo amostral

O cálculo amostral apontou para um total de 90 participantes considerando os grupos acima com base no estudo de Wauters e colaboradores (2021), que classificou o grau de severidade dos pacientes com infecção pulmonar (28). Considerando um poder de 90%, nível de significância de 5% e tamanho de efeito de 0.40 para diferenças nos níveis celulares no aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave em comparação a pacientes controles, com infecção pulmonar viral não COVID-19 ou infecção pulmonar bacteriana.

2.4 Critério de inclusão

Pacientes de ambos os gêneros, internados em Unidade de Terapia Intensiva ventilando com ventilação invasiva e intubação orotraqueal, a partir dos três meses de idade até 65 anos, internados por infecção respiratória decorrente de vírus ou bactérias, conforme diagnóstico realizado como rotina assistencial pelo hospital de internação, os quais

os responsáveis assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 4).

No caso dos pacientes infantis, o TCLE também será assinado pelo responsável (ANEXO 5). No ato da assinatura será explicado que se trata de um projeto de pesquisa, e que será utilizada a amostra removida da secreção pulmonar destinada para descarte.

A coleta de sangue será feita somente na população adulta. No caso de coleta de sangue não será feita essa observação de descarte.

2.5 Critério de exclusão

Serão excluídos da amostra pacientes internados nas UTIs dos hospitais participantes que não apresentarem condições clínicas/prescrição médica para coleta de aspirado pulmonar pela equipe de fisioterapia, ou os quais os representantes legais não autorizem a participação no estudo.

2.6 Testes de detecção viral

As técnicas de identificação viral em aspirado nasofaríngeo constitui-se a rotina assistencial determinada para todos os paciente com suspeita clínica de Infecção do Trato Respiratório Inferior (ITRI) por vírus que internam em Unidade de Terapia Intensiva. Não haverá participação do grupo de pesquisa no encaminhamento do material assim como na realização da técnica laboratorial.

Na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), a realização da detecção viral para Vírus Sincicial Respiratório e Influenza A e B é realizada através da imunofluorescência indireta das secreções. Este método da imunofluorescência indireta é realizado com a utilização de anticorpos monoclonais, sendo o método de escolha para o diagnóstico viral em nosso meio, por permitir um diagnóstico diferencial entre vírus e por apresentar uma sensibilidade e especificidade de 57% a 90% ou mais.

No Hospital Universitário de Canoas, a realização da detecção viral para Vírus Sincicial Respiratório e Influenza A e B é realizada através do método Imunocromatográfico. A Sensibilidade ao redor de 50-70% (aspirado nasal) e especificidade de 90-95%. A detecção de COVID-19 é realizada no Laboratório Central do estado do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) através da técnica de detecção viral por RT-PCR. A amostra pode ser coletada através de Aspirado de Secreção de Nasofaringe ou Swab nasofaríngeo.

2.7 Coleta do AT (apenas de pacientes internados, com intubação oro-traqueal e prescrição para o procedimento).

A coleta desse material será realizada pela equipe de fisioterapia que realiza atendimento na rotina assistencial da Unidade de Terapia Intensiva.

Descrição do procedimento de coleta de aspirado traqueal que é realizado rotineiramente pelos fisioterapeutas: A coleta da secreção é realizada através de sonda de aspiração nº 12; e frasco coletor de aspiração apenas de pacientes com prescrição médica para a coleta. O profissional, paramentado com luvas de látex, máscara N95, óculos de proteção e avental descartável quando em isolamento de contato, conecta o extensor de aspiração transparente no frasco de vácuo na saída de ar da parede e, na outra extremidade, o frasco coletor de aspiração, seguido da sonda de aspiração número 12, conectada no segundo orifício do frasco. Posteriormente, calça a luva estéril na mão dominante para segurar a sonda de aspiração durante o procedimento, e com a mão contralateral desconectar o circuito da ventilação mecânica da via aérea artificial (tubo orotraqueal ou traqueostomia). Em seguida, insere a sonda de aspiração com o vácuo clampeado na via aérea inferior até ocorrer o estímulo de tosse ou resistência no trajeto. Nessa etapa, ele abre o vácuo e vira retirando a sonda lentamente em movimentos circulares, não ultrapassando o tempo máximo de 15 segundos durante o procedimento. Ao finalizar a aspiração, o paciente retorna para a

ventilação mecânica e a sonda e a luva estéril serão devidamente descartadas no lixo correspondente. O frasco coletor de aspiração é fechado e etiquetado com identificação do paciente, data da coleta e especificação da via aérea coletada. Para pacientes ventilando espontaneamente, é adotada a mesma rotina de coleta, porém a aspiração ocorre pelas vias aéreas superiores por via nasal. Quando a secreção apresentar consistência espessa pode ser acrescido 1 ml de soro fisiológico 0,9% se houver necessidade para fluidificar a secreção e facilitar seu processamento para análise. A secreção aspirada no frasco coletor não terá contato com o meio externo ou contato do examinador. A amostra de aspirado traqueal será encaminhada, através de uma caixa de transporte de material biológico com termômetro digital, para análise no Laboratório de Imunovirologia da UFCSPA no prazo máximo de 4 horas após a coleta, mantendo-a sob refrigeração nesse intervalo de tempo, para processamento e análises cabíveis. O transporte desse material biológico será realizado pelos pesquisadores do projeto, previamente contatados. O transporte da Santa Casa para a UFCSPA será realizado em caixa de transporte de amostras biológicas, como essas instituições ficam fisicamente próximas, a amostra será transportada manualmente pelos pátios das instituições. No caso do Hospital da Ulbra, será utilizado o carro da UFCSPA, previamente agendado.

2.8 Coleta de sangue periférico - somente paciente adulto

De acordo com as condições clínicas dos pacientes adultos internados, desde que autorizado pelo médico responsável através de prescrição em prontuário, e concordado por meio do TCLE. Serão coletados 8 mL de sangue venoso através de punção da veia antecubital ao acesso em tubos contendo EDTA. O sangue será coletado por profissional da equipe de Enfermagem da UTI, no mesmo momento de coleta de sangue para outras análises solicitadas pelo médico assistente, será enviado para o laboratório da UFCSPA pelos próprios pesquisadores do projeto. A amostra de sangue será analisada a partir de uma única

amostra, somente nos pacientes adultos. O transporte desse material biológico será realizado pelos pesquisadores do projeto. O transporte da Santa Casa para a UFCSPA será realizado em caixa de transporte de amostras biológicas, como essas instituições ficam fisicamente próximas, a amostra será transportada manualmente pelos pátios das instituições. No caso do Hospital da Ulbra, será utilizado o carro da UFCSPA, previamente agendado.

2.9 Obtenção de plasma, células mononucleares do sangue periférico e de células do AT

O sangue será utilizado para separação de células mononucleares periféricas utilizando-se Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, EUA) e após separação, as células mononucleares periféricas serão criopreservadas (solução 90% soro fetal bovino e 10% DMSO) em nitrogênio líquido e serão utilizadas para as análises aqui propostas após descongelamento e verificação da viabilidade. O plasma será alíquota em microtubos e congelado em -20°C para análises posteriores. Para obtenção de células do aspirado traqueal, o fluido será diluído em proporção 1:1 com 0.1 M de ditiotreitol (ThermoFisher, EUA) e incubado por 15 min a 37°C. A solução então será centrifugada (750g, 4°C, 10 min) e as células serão utilizadas para citometria de fluxo. O sobrenadante será preservado em -20°C para avaliação de citocinas.

2.10 Caracterização de Macrófagos por imunofenotipagem

A caracterização e quantificação da população de macrófagos será realizada pela técnica citometria de fluxo. Após o isolamento das células das amostras de sangue periférico e de aspirado traqueal como mencionado, as células serão marcadas com anticorpos monoclonais com fluorescência e analisados no citômetro BD FACSCanto™. Para todos os experimentos, a fenotipagem das células será feita por coloração de

viabilidade celular em combinação com marcadores canônicos de superfície dos macrófagos: CD3, CD45, CD11b, CD68.

2.11 Caracterização de células TRM por imunofenotipagem

A caracterização e quantificação da população celular TRM será realizada pela técnica citometria de fluxo. Após a obtenção das células do aspirado traqueal, estas serão marcadas com anticorpos monoclonais com fluorescência e analisados no citômetro BD FACSCanto™. Para todos os experimentos, a fenotipagem das células será feita por coloração de viabilidade celular em combinação com marcadores canônicos de superfície das células T, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD69 e CD103.

2.12 Caracterização de células dendríticas por imunofenotipagem

A caracterização e quantificação da população de células dendríticas será realizada pela técnica citometria de fluxo. Após a obtenção das células do aspirado traqueal como mencionado, estas serão marcadas com anticorpos monoclonais com fluorescência e analisados no citômetro BD FACSCanto™. Para todos os experimentos, a fenotipagem das células será feita por coloração de viabilidade celular em combinação com marcadores canônicos de superfície dos macrófagos: CD3, CD45, CD11b, CD68.

2.13 Análises de citocinas intracelulares

A análise de citocinas e funcionalidade dos linfócitos e demais células será realizada por citometria de fluxo, através de anticorpos monoclonais específicos para as principais citocinas de resposta contra vírus, conjugados com fluorocromos. Para essa análise as células obtidas do aspirado traqueal serão tratadas com antígenos (proteínas). Essa análise será realizada em amostras de aspirado traqueal apenas. Serão analisadas as seguintes citocinas: TNF: IFN: IL-2.

2.14 Contagem diferencial de Aspirado traqueal

As amostras de aspirado traqueal serão submetidas à prévia centrifugação, o sobrenadante descartado e as células serão ressuspensas e submetidas à cito-centrifugação. Nas lâminas provenientes da citocentrífuga serão realizadas colorações de Giemsa de cada amostra de aspirado traqueal, segundo os respectivos protocolos padrões de coloração. Estas lâminas serão avaliadas posteriormente em microscópio quanto à celularidade e preservação das células.

2.15 Metodologia da análise dos dados dos pacientes

Para seleção dos pacientes, os dados clínicos e laboratoriais referentes ao paciente serão acessados via prontuário eletrônico pelo médico participante da pesquisa científica. Esses dados incluem histórico médico, parâmetros clínicos e manejos do paciente durante a infecção, como também serão avaliados os dados laboratoriais como hemograma e bioquímica, também por meio da avaliação e arquivos dos pacientes (ANEXO 6).

2.16 Levantamento de dados de prontuário

Os dados do prontuário clínico dos pacientes serão analisados para coleta de informações como idade, sexo, presença de comorbidade, medicações e outras informações relevantes para o estudo. Para a identificação dos nomes serão sempre utilizados códigos. A informação para acesso a esses dados constam no TCLE. Os dados dos prontuários dos pacientes participantes do estudo serão coletados pelos alunos de pós-graduação (mestrado e doutorado) com dissertação e teses vinculadas a esse projeto. O acesso aos prontuários será dado pelo responsável pelo setor específico, e serão acessados a partir de equipamento de computador da Santa Casa de Misericórdia, utilizando a rede Tazy.

2.17 Análise estatística

A normalidade dos dados será testada pelo teste de Kolgomorov-Smirnov e os dados serão apresentados através de média $\pm$ desvio padrão. Uma análise de variância de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. 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.

2.18 Escore de Gravidade

As taxas de mortalidade, ajustadas com base nas predições de mortalidade fornecidas por sistemas de escore prognóstico, vêm sendo cada vez mais utilizadas para comparar a qualidade do cuidado fornecido por diferentes UTI e hospitais. Estas "taxas de mortalidade ajustadas pela gravidade" podem ser utilizadas para uma "comparação" com instituições similares ou reconhecidas como de alto desempenho, com a finalidade de identificar as deficiências da instituição no desfecho clínico e enfatizar áreas passíveis de melhoria. Os sistemas utilizam dados de fisiologia aguda, diagnóstico agudo, condições crônicas de saúde e características do índice quando da internação à UTI, para preverem a mortalidade hospitalar.

O APACHE II (anexo 1) (33) é um sistema médico de classificação que determina os índices de gravidade de um paciente internado em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Recomendado pelo Ministério da Saúde, o índice é calculado a partir da soma de 12 critérios clínicos, fisiológicos e laboratoriais, que determinam a criticidade do quadro do paciente e o risco de óbito nas suas primeiras 24 horas de UTI. O monitoramento dessas taxas promove maior

resolutividade no atendimento intensivo e credita o Hospital com a garantia de prognósticos mais efetivos.

O PIM (34) (ANEXO 2), sigla para o inglês Pediatric Index of Mortality, publicado em 1997 e a seguir, em 2003, sua nova versão, PIM-2, que se baseia em dez variáveis coletadas no momento da internação, reduzindo possíveis interferências que possam decorrer de diferentes estratégias de manejo intensivo.

O sistema prognóstico SAPS 3 (Anexo 3) (35) (*Simplified Acute Physiology Score*) foi recentemente desenvolvido em coorte mundial. Ele é composto de 20 diferentes variáveis facilmente mensuráveis na admissão do paciente a UTI. As variáveis são divididas em três partes, variáveis demográficas, razões pela admissão na UTI e variáveis fisiológicas, elas representam o grau de comprometimento da doença e avaliação do estado de saúde prévio à admissão hospitalar, indicadora da condição pré-mórbida. Para cada uma das variáveis analisadas confere-se um peso, conforme a gravidade do distúrbio fisiológico. Na teoria, o menor valor atribuído pelo score é 16 e o maior é 217 pontos. As variáveis fisiológicas que compõem o score fisiológico agudo são: temperatura, pressão arterial sistólica, frequência cardíaca e respiratória, oxigenação, pH arterial, sódio, potássio, creatinina, bilirrubina, hematócrito, leucócitos, plaquetas e escala de coma de Glasgow.

2.19 Descarte de resíduos

O descarte será realizado com as amostras acondicionadas em sacos BRANCOS, contendo o símbolo universal de risco biológico de tamanho compatível com a quantidade. A substituição do saco ocorrerá quando forem atingidos 2/3 de sua capacidade, e pelo menos uma vez a cada 24 horas. De acordo com a resolução 358/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), não há necessidade de tratamento prévio, podendo ser encaminhado para local devidamente licenciado para disposição final de resíduos do serviço de saúde. Todo o procedimento

será realizado obedecendo às normas de biossegurança para material biológico. Resolução Nº 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005.

2.20 Considerações Éticas

Este projeto será submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, registrado na UFCSPA e hospital ULBRA/Canoas. Como se trata de uma população impossibilidade de capacidade de decisão, por internação em UTI e intubação, o projeto será apresentado para os responsáveis legais, que decidirão se autorizam ou não a inclusão do paciente na pesquisa. A apresentação do projeto será realizada por alunos de graduação e pós-graduação envolvidos no projeto, previamente treinados. O treinamento e acompanhamento das abordagens dos responsáveis pelos pacientes potenciais participantes da pesquisa será realizado pelo Coordenador do projeto, pela Médica e mestranda com dissertação em tema do projeto Maria Eduarda Drumm e pelo Médico Pediatra Dr.Cristiano De Leon, participante do projeto. A inclusão será realizada somente após esclarecimentos, aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 4 - adultos e ANEXO 5- Pediátrico). Todo o procedimento será organizado junto com os profissionais da UTIs participantes. Não haverá nenhuma abordagem de responsável de pacientes sem o consentimento e dos médicos responsáveis. Este projeto de pesquisa seguirá as Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a pesquisa em saúde, do Conselho Nacional em Saúde, segundo a Resolução 466/12. As instituições nas quais o projeto será desenvolvido irão autorizar sua realização por meio do Termo de Anuência.

2.21 Riscos:

Os riscos não estão diretamente relacionados ao projeto, apenas aqueles da coleta de rotina. Tanto a coleta de sangue como o procedimento de aspiração de secreção traqueal fazem parte da rotina assistencial do profissional fisioterapeuta como do médico assistente do participante da pesquisa internado na UTI, e serão realizados pela equipe de Fisioterapia ou Enfermagem da UTI, onde o paciente é continuamente monitorizado e rapidamente atendido ao sinal de qualquer instabilidade hemodinâmica ou hipoxemia decorrente do procedimento. O risco consiste em potencial desconforto na coleta de sangue, dor no local da picada, formação de hematomas (manchas roxas) no local da coleta e tonturas, provenientes da punção venosa, que serão acompanhados pela equipe de coleta, conforme procedimentos de rotina.

2.22 Benefícios:

Com relação aos benefícios, a participação neste estudo permitirá o desenvolvimento de conhecimento que contribuirá para saúde pública, levando ao avanço do conhecimento e criação de estratégias de terapias e vacinação e terapêutica, visando o manejo das doenças pulmonares virais graves. O estudo também contribuirá para o entendimento da biologia dos linfócitos TRM humanos em infecções virais pulmonares. Os participantes não receberão de forma direta nenhum benefício.

2.23 Confidencialidade:

Os pesquisadores se comprometem a manter o sigilo e privacidade dos participantes durante todas as fases da pesquisa. É garantida confidencialidade em não divulgar a terceiros a natureza e o conteúdo de qualquer informação que componha ou tenha resultado de atividades técnicas do projeto de pesquisa; a não permitir a terceiros o manuseio de qualquer documentação que componha ou tenha resultado de atividades do projeto de pesquisa; a não explorar, em benefício próprio, informações e documentos adquiridos através da participação em atividades do projeto de pesquisa; a não permitir o uso por outrem de informações e

documentos adquiridos através da participação em atividades do projeto de pesquisa.

3- Orçamento:

O laboratório de Imunovirologia da UFCSPA, em parceria com o laboratório de imunoterapia da UFCSPA, obtiveram financiamento de fontes externas, CAPES, com o edital de Seleção Emergencial II CAPES - Fármacos e Imunologia - CAPES-EPIDEMIAS - Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias.

Assim, os reagentes e kits, assim como equipamentos para realização deste projeto estão disponíveis no Laboratório de Imunovirologia e no laboratório de imunoterapia da UFCSPA, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Junior, pois foram adquiridos com os recursos acima identificados. A execução do projeto será realizada com o apoio de uma equipe de trabalho que contempla professores de diferentes áreas, pesquisadores em estágio de pós-doutorado, aluno de doutorado, alunos de mestrado e alunos de iniciação científica.

Orçamento

CONSUMO	Valor R\$
Materiais plásticos descartáveis diversos e EPIs Placas de cultura, tubos de microcentrifuga tubos de tubos de congelamento, tubos para citometria, luvas cirúrgicas, ponteiros, tubos de congelamento, filtro de 0.45µm e filtro de 0.22 µm tubo EDTA)	R\$ 8.000,00
Reagentes diversos: álcool 70%, sais, tampões, Soro feral Bovino (SFB)kits para dosagem de citocinas, corantes de viabilidade, reagentes para coloração intracelular.	R\$ 20.000,00
Anticorpos para citometria (diversos conforme metodologia)	R\$ 25.000,00
Materiais para coleta do aspirado traqueal: luva látex, luva plástica estéril, extensor de aspiração, sonda de aspiração nº 12, coletor de LBA	R\$ 3.000,00
TOTAL	R\$56.000,00

4- Cronograma:

Atividade								
	2/2023	1/2024	2/2024	1/2025	2/2025	1/2026	2/2026	1/2027
Submissão, análise e aprovação do projeto em comitê de ética	x	x						
Recrutamento de pacientes participantes, coletas de amostras e análises laboratoriais		x	x	x	x	x	x	
Otimização e adaptação de protocolos experimentais)		x						
Quantificação de citocinas em amostras refrigeradas		x	x	x	x	x	x	
Tabulação e análise dos dados obtidos das amostras dos participantes da pesquisa		x	x	x	x	x	x	
Análise dos dados dos prontuários e correlações clínicas		x	x	x	x	x	x	
Preparação de relatório e artigo científico							x	x

5- Resultados esperados

Principais resultados esperados:

- a) Geração de novos conhecimentos que irão auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na imunopatogenia das infecções pulmonares virais.
- b) Contribuição para o conhecimento de linfócitos TRMs pulmonares, uma vez que eles foram recentemente identificados, foi comprovado o seu papel na proteção ou imunopatogêneses de infecções virais e bactérias pulmonares, entretanto pouco ainda se conhece do papel dessas células na imunidade.
- c) Formação de recursos humanos na área de Imunovirologia em nível de graduação e pós-graduação
- d) Fortalecimento da pesquisa em Imunologia de vírus no Estado do Rio Grande do Sul
- e) Consolidação de parcerias com pesquisadores da UFCSPA e hospital Santa Casa de Misericórdia para a produção de conhecimento aplicado a saúde.
- f) Publicação de artigos científicos internacionais.

6- Referências:

1. Liu Y-C, Kuo R-L, Shih S-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J* [Internet]. 2020 Aug;43(4):328–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2319417020300445>
2. Erbeling EJ, Post DJ, Stemmy EJ, Roberts PC, Augustine AD, Ferguson S, et al. A Universal Influenza Vaccine: The Strategic Plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *J Infect Dis* [Internet]. 2018 Jul 2;218(3):347–54. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/218/3/347/4904047>
3. Ziogas A, Netea MG. Trained immunity-related vaccines: innate immune memory and heterologous protection against infections. *Trends Mol Med*. 2022 Jun;28(6):497–512. doi: 10.1016/j.molmed.2022.03.009. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35466062.
4. Choi H, Song H, Jung YW. The Roles of CCR7 for the Homing of Memory CD8+ T Cells into Their Survival Niches. *Immune Netw* [Internet]. 2020;20(3). Available from: <https://immunetwork.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2020.20.e20>
5. Szabo PA, Miron M, Farber DL. Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Sci Immunol*. 2019;4(34):1–12.
6. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(11):749–61.
7. Jameson SC, Masopust D. Diversity in T Cell Memory: An Embarrassment of Riches. *Immunity* [Internet]. 2009 Dec;31(6):859–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476130900507X>
8. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat Protoc* [Internet]. 2014 Jan 2;9(1):209–22. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2014.005>
9. Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ TRM cells providing global skin immunity. *Nature* [Internet]. 2012 Mar 8;483(7388):227–31. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10851>
10. Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, Pauken KE, Vezys V, Masopust D. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science (80-)* [Internet]. 2014 Oct 3;346(6205):98–101. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1254536>
11. Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V, Masopust D. Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 May 31;14(5):509–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.2568>
12. Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrançois L, Farber DL. Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *J Immunol* [Internet]. 2011 Dec 1;187(11):5510–4. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/187/11/5510/85577/Cutting-Edge-Tissue-Retentive-Lung-Memory-CD4-T>
13. Turner DL, Bickham KL, Thome JJ, Kim CY, D'Ovidio F, Wherry EJ, et al. Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2014 May;7(3):501–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933021922010674>
14. Gebhardt T, Palendira U, Tschärke DC, Bedoui S. Tissue-resident memory T cells in tissue homeostasis, persistent infection, and cancer surveillance. *Immunol Rev* [Internet]. 2018 May;283(1):54–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jmr.12650>
15. Takamura S. Niches for the Long-Term Maintenance of Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 31;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01214/full>
16. Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, Liao Y, Nota B, Seillet C, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science (80-)* [Internet]. 2016 Apr 22;352(6284):459–63. Available

- from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad2035>
17. Fonseca R, Burn TN, Gandolfo LC, Devi S, Park SL, Obers A, et al. Runx3 drives a CD8+ T cell tissue residency program that is absent in CD4+ T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2022 Aug 26;23(8):1236–45. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41590-022-01273-4>
 18. Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, Liao Y, Nota B, Seillet C, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Apr 22;352(6284):459–63. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad2035>
 19. Wakim LM, Waithman J, van Rooijen N, Heath WR, Carbone FR, Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319, 198–202 (2008)
 20. Gebhardt T et al., Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* 10, 524–530 (2009).
 21. Masopust D et al., Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* 207, 553–564 (2010).
 22. Teijaro JR et al., Cutting edge: tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J Immunol* 187, 5510–5514 (2011).
 23. Turner DL, Bickham KL, Thome JJ, Kim CY, D'Ovidio F, Wherry EJ, et al. Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2014 May 25;7(3):501–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/mi201367>
 24. Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V, Masopust D. Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 May 31;14(5):509–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.2568>
 25. Ge C, Monk IR, Pizzolla A, Wang N, Bedford JG, Stinear TP, et al. Bystander Activation of Pulmonary TRM Cells Attenuates the Severity of Bacterial Pneumonia by Enhancing Neutrophil Recruitment. *Cell Rep* [Internet]. 2019 Dec;29(13):4236–4244.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124719316031>
 26. Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, Pauken KE, Vezys V, Masopust D. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* (80-) [Internet]. 2014 Oct 3;346(6205):98–101. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1254536>
 27. Pizzolla A, Nguyen THO, Smith JM, Brooks AG, Kedzierska K, Heath WR, et al. Resident memory CD8 + T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection. *Sci Immunol* [Internet]. 2017 Jun 9;2(12). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.aam6970>
 28. Roukens AHE, Pothast CR, König M, Huisman W, Dalebout T, Tak T, et al. Prolonged activation of nasal immune cell populations and development of tissue-resident SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses following COVID-19. *Nat Immunol* [Internet]. 2022 Jan 22;23(1):23–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01095-w>
 29. Maini M, Diniz M, Mitsi E, Swadling L, Ferreira D. Airway-resident functional T cell responses against SARS-CoV-2 in unexposed individuals. 2022;0–22.
 30. Ssemaganda A, Nguyen HM, Nuhu F, Jahan N, Card CM, Kiazzyk S, et al. Expansion of cytotoxic tissue-resident CD8+ T cells and CCR6+CD161+ CD4+ T cells in the nasal mucosa following mRNA COVID-19 vaccination. *Nat Commun* [Internet]. 2022 Dec 10;13(1):3357. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-30913-4>
 31. Altarawneh HN, Chemaitelly H, Ayoub HH, Tang P, Hasan MR, Yassine HM, et al. Effects of Previous Infection and Vaccination on Symptomatic Omicron Infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2022 Jul 7;387(1):21–34. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2203965>
 32. Fazolo T, Lima K, Fontoura JC, de Souza PO, Hilario G, Zorzetto R, et al. Pediatric COVID-19 patients in South Brazil show abundant viral mRNA and strong specific anti-viral responses. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec

- 25;12(1):6844. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27120-y>
33. Knaus WA, et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985 Oct;13(10):818-29. PubMed ID: 3928249.
 34. Shann F. Are we doing a good job: PRISM, PIM and all that. *Intensive Care medicine*. 2002;28(2):105–107.
 35. Metnitz PG, Moreno RP, Almeida E et al. – SAPS 3 – From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 1: Objectives, methods and cohort description. *Intensive Care Med* 2005; 31:1336-1344.
 36. Wauters E, Van Mol P, Garg AD, Jansen S, Van Herck Y, Vanderbeke L, et al. Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. *Cell Res* [Internet]. 2021 Mar 21;31(3):272–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41422-020-00455-9>.

Anexo 1

Sistema de pontuação e estimativas de mortalidade APACHE II (sistema de classificação II de fisiologia aguda e doenças crônicas)

Temperatura (Graus C)

36 a 38,4 (0 pontos)

Pressão arterial média (mmHg)

70 a 109 (0 pontos)

Frequência cardíaca

70 a 109 (0 pontos)

Frequência respiratória

12 a 24 (0 pontos)

A-aPO₂ (FiO₂>50%) ou PaO₂ (FiO₂<50%)

< 200 ou PaO₂ > 70 (0 pontos)

pH ou HCO₃

7,33 a 7,49 ; 22 a 31,9 (0 pontos)

Na⁺ sérico (mEq/l)

130 a 149 (0 pontos)

K⁺ sérico (mEq/l)

3,5 a 5,4 (0 pontos)

Creatinina sérica (ARF significa insuficiência renal aguda)

0,6 a 1,4 (0 pontos)

Hematócrito

30 a 45,9 (0 pontos)

Contagem de WBC - leucócitos - (10⁹/l)

3 a 14,9 (0 pontos)

Escala Glasgow

15 (0 pontos)

Idade (anos)

<= 44 (0 pontos)

Problemas de saúde crônicos: 1) Cirrose do fígado confirmada por biópsia 2) Classe IV da New York Heart Association 3) DPOC severa -- hipercapnia, uso de O2 domiciliar, ou hipertensão pulmonar 4) Em diálise regular ou 5) Imunodeprimido

- ☒ nenhum (0 pontos)
- ☐ não cirúrgico (5 pontos)
- ☐ cirurgia de emergência (5 pontos)
- ☐ cirurgia eletiva (2 pontos)

Contagem de pontos, critérios totais:

Anexo 2 – PIM II
PIM 2 (Índice Pediátrico de Mortalidade)

Variáveis (ajuda)	Valores (1 se sim, 0 caso contrário)	Beta
admissão eletiva	☐	0
Pós-procedimento de recuperação	☐	0
bypass cardíaco	☐	0
Diagnóstico de alto risco	☐	0
Diagnóstico de baixo risco	☐	0
Nenhuma resposta das pupilas à luz brilhante (> 3 mm e ambas fixas)	☐	0
Ventilação mecânica (a qualquer momento durante a primeira hora na UTI)	☐	0
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	120	0,01395
Excesso de base (mmHg) (sangue arterial ou capilar)	0	0,1040
FiO2*100/ PaO2 (mmHg)		

Anexo 3 – SAP 3

<i>Variáveis</i>	<i>Pontos</i>	<i>Variáveis</i>	<i>Pontos</i>
Idade		Dias de internação prévios	
< 40	0	< 14	0
≥ 40-<60	5	≥ 14-28	6
≥ 60-< 70	9	≥ 28	7
≥ 70-< 75	13	Procedência	
≥ 75-<80	15	Centro cirúrgico	0
≥ 80	18	Pronto Socorro	5
Comorbidades		Outra UTI	7
Outras	0	Outros	8
Quimioterapia	3	Fármacos vasoativos	
ICC NYHA IV	6	Sim	0
Neoplasia hematológica	6	Não	3
Cirrose	8		
Aids	8		
Metástase	11		

<i>Variável</i>	<i>Pontos</i>	<i>Variável</i>	<i>Pontos</i>
Admissão programada	0	Motivo de internação / Admissão	
Admissão não programada	3	Neurológicas	
Urgência / Cirurgia na admissão / status cirúrgico		Consultas	-4
Não cirúrgico	5	Coma, confusão, agitação	4
Eletivo / Planejada	0	Deficit Focal	7
Emergência	6	Eleito de massa intracraniana	11
Tipo de operação		Cardiológicas	
Transplantes	-11	Arritmia	-5
Trauma	-8	Choque hemorrágico	3
RM sem valva	-6	Choque hipovolêmico não hemorrágico	3
Cirurgia no AWC	5	Choque distributivo	5
Outras	0	Abdomen	
Admissão na UTI acrescentar 15 pontos	15	Abdomen agudo	3
		Pancreatite grave	8
		Falência hepática	6
		Outras	0
		Infecção	
		Neocômial	4
		Respiratória	5
		Outras	0

Variáveis	Pontos	Variáveis	Pontos
Glasgow		Temperatura	
3 - 4	15	< 34,5	7
5	10	≥ 34,5	0
6	7	Leucócitos	
7 - 12	2	< 15.000	0
≥ 13	0	≥ 15.000	2
Frequência cardíaca		Plaquetas	
< 120	0	< 20.000	13
≥ 120 - < 160	5	≥ 20.000 - < 50.000	8
≥ 160	7	≥ 50.000 - < 100.000	5
Pressão arterial sistólica		≥ 100.000	0
< 40	11	pH	
≥ 40 - < 70	8	≤ 7,25	3
≥ 70 - < 120	3	> 7,25	0
≥ 120	0	Creatinina	
Oxigenação		< 1,2	0
com VM e relação PaO ₂ /FiO ₂ < 100	11	≥ 1,2 - < 2,0	2
com VM e relação PaO ₂ /FiO ₂ ≥ 100	7	≥ 2,0 - < 3,5	7
Sem VM e PaO ₂ < 60	5	≥ 3,5	0
Sem VM e PaO ₂ ≥ 60	0	Bilirrubina	
		< 2	0
		≥ 2 - < 6	4
		≥ 6	5

Anexo 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização de linfócitos T residentes de memória em infecções pulmonares virais de pacientes hospitalizados - participante adulto

Você está sendo convidado(a) a escolher se permite a participação de do paciente que você é responsável no projeto "Caracterização de linfócitos T residentes de memória em infecções pulmonares virais de pacientes hospitalizados", cujo objetivo é estudar as células no pulmão de pacientes com infecções nesse órgão, com o propósito de encontrar correlações imunológicas que possibilitam o desenvolvimento de tratamentos e melhorias futura no manejo clínico desses pacientes. Este estudo está sendo realizado nos hospitais Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Santa Clara e Unidade de Terapia Intensiva pediátrica Hospital da Criança Santo Antônio da Irmandade Santa Casa de Porto Alegre e Unidade de Terapia Intensiva adulto e pediátrica do Hospital Universitário de Canoas, e visa auxiliar no conhecimento sobre a resposta imunológica formada no pulmão, em infecções virais.

Informações Importantes:

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) explica tudo sobre o estudo e solicita a sua permissão para a participação do paciente, e para que as informações obtidas a partir da análise da amostra do paciente que você é responsável sejam publicadas em meios científicos com profissionais da saúde ou afins.

A sua escolha quanto a autorização para que o paciente que você é responsável participe é voluntária, e a sua permissão é fundamental para que ele participe.

Você tem plena liberdade de recusar que o paciente participe, ou mesmo ele, como participante da pesquisa, não desejar participar, assim que estiver em condições físicas e psíquicas para avaliar, pode solicitar a retirada do consentimento do estudo a qualquer momento. Isso não afetará de forma alguma o atendimento que ele recebe ou possa vir a receber na instituição.

Informações da sobre as amostras que serão utilizadas:

Para que essa pesquisa seja realizada será utilizada amostra do aspirado traqueal (secreção que o paciente produz durante a infecção pulmonar, ou outra situação que o tenha levado a UTI por problemas respiratórios). A coleta desse material é feita pela equipe de fisioterapia responsável por esse procedimento na rotina. As amostras de aspirado traqueal serão coletadas junto ao processo de aspiração de rotina. Esse material que utilizaremos é normalmente descartado pelo hospital. Nós utilizaremos essa secreção para estudo. **Para acompanhamento da evolução dessas células, caso o paciente continue em intubação e autorizado no TCLE, serão analisadas células amostras de três coletas de aspirado traqueal. Primeira coleta entre o primeiro e terceiro dia de internação, segunda coleta entre o sétimo e oitavo dia de internação e terceira coleta entre o décimo segundo e decido quinto dia de internação.**

Também será coletado um tubo de sangue venoso contendo 8 mL de sangue. Essa coleta será realizada pela equipe de Enfermagem que atende o paciente, no momento da coleta de sangue para outros exames. O paciente não será picado novamente.

Os resultados das análises dessas amostras serão relacionados com outros parâmetros como idade, resultados de exames laboratoriais e outras condições, que serão retiradas do do prontuário clínico do paciente que você é responsável.

Riscos:

Os riscos são inerentes aos procedimentos da rotina de aspiração ou de coleta de sangue. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais treinados e habilitados, seguindo os protocolos de atendimento e de realização dos testes. Esses procedimentos já são realizados no paciente internado. Diante de eventuais danos, comprovadamente provenientes da pesquisa, o responsável poderá pleitear indenização.

Benefícios:

O benefício da participação do paciente na pesquisa será contribuir para o entendimento do desenvolvimento da imunidade contra essa infecção e para a geração de novas terapias. A participação na pesquisa é voluntária.

Outras Considerações:

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa. Você e o paciente não terão nenhum custo para participação na pesquisa.

Confidencialidade:

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, e com anuência do Hospital Universitário de Canoas, a fim garantir que seus direitos e bem-estar sejam protegidos. Os dados serão utilizados unicamente para fins científicos e apresentados para o Ministério da Saúde. Fica garantido de que em momento algum o nome dos participantes será divulgado. Todas as informações coletadas irão respeitar o sigilo de confidencialidade de dados. Se você ou seu (s) representante (s) tiver (em) dúvidas sobre este estudo, pode entrar em contato com o pesquisador responsável “Dr. Luiz Carlos Rodrigues Junior, Endereço: Rua Sarmento Leite, 245 – Porto Alegre/RS – UFCSPA, prédio 3, laboratório de imunoterapia (813). Telefone: (51) 3303-8874, luizcrj@ufcspa.edu.br”. Caso haja alguma dúvida sobre seus direitos como participante de pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, localizado na Av. Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17 - Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar - Bairro Centro Histórico, Porto Alegre/RS, (51) 3214 8571, cep@santacasa.tche.br, Segunda a sexta das 9h às 12h e das 13:30h às 17h ou CEP/UFCSPA Rua Sarmento Leite, 245 – Porto Alegre Sala 605, prédio 3 Telefone 51 3303-8804 Email: cep@ufcspa.edu.br Horário de Atendimento ao público: 08:00 às 12:00 horas / 13:00 às 17:00 horas.

Este termo é assinado em duas vias, sendo uma para o responsável pelo paciente e outra para os pesquisadores. Ao assinar, você confirma a participação do paciente na pesquisa, indicando que entendeu as informações fornecidas, os procedimentos do estudo e que teve a oportunidade de fazer perguntas e tirar dúvidas sobre o que foi lido e explicado.

Por favor, marque com um X:

Eu concordo com a coleta de sangue?

☐ NÃO ☐ SIM

Eu concordo com a coleta de aspirado traqueal?

☐ NÃO ☐ SIM

Eu concordo com a coleta sequencial de mais duas amostras?

☐ NÃO ☐ SIM

Assinaturas:

RESPONSÁVEL PELO PACIENTE:

Nome completo: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do paciente: _____ Nº do prontuário: _____

PESQUISADOR QUE APLICOU O TERMO:

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Cidade: _____ Data: _____

Anexo 5

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização de linfócitos T residentes de memória em infecções pulmonares virais de pacientes hospitalizados - Participante Infantil

Você está sendo convidado(a) a permitir a participação da criança sob sua responsabilidade (para a qual você é nomeado responsável) no projeto "Caracterização de linfócitos T residentes de memória em infecções pulmonares virais de pacientes hospitalizados", cujo objetivo é estudar as células no pulmão de pacientes com infecções nesse órgão, com o propósito de encontrar correlações imunológicas que possibilitem o desenvolvimento de tratamentos e melhorias no manejo clínico desses pacientes. Este estudo está sendo realizado nos hospitais Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Santa Clara e Unidade de Terapia Intensiva pediátrica Hospital da Criança Santo Antônio da Irmandade Santa Casa de Porto Alegre e Unidade de Terapia Intensiva adulto e pediátrica do Hospital Universitário de Canoas, e visa auxiliar no conhecimento sobre a resposta imunológica formada no pulmão, em infecções virais.

Informações Importantes:

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) explica tudo sobre o estudo e solicita a sua permissão para a participação do paciente, e para que as informações obtidas a partir da análise da amostra do paciente que você é responsável sejam publicadas em meios científicos com profissionais da saúde ou afins.

A autorização para a participação da criança sob sua responsabilidade é fundamental para que ela participe.

Como responsável você poderá retirar o consentimento durante o estudo a qualquer momento, isso não afetará de forma alguma o atendimento que ele está recebendo ou poderá vir a receber nessa instituição.

Informações da sobre as amostras que serão utilizadas:

Para que essa pesquisa seja realizada será utilizada amostra do aspirado traqueal (secreção que o paciente produz durante a infecção pulmonar ou outra situação que o tenha levado a UTI por problemas respiratórios). A coleta desse material será feita pela equipe de fisioterapia responsável por esse procedimento na rotina. As amostras de aspirado traqueal serão coletadas

junto ao processo de aspiração de rotina. Esse material que utilizaremos é normalmente descartado pelo hospital. Nós utilizaremos essa secreção para estudo. . Para acompanhamento da evolução dessas células, caso o paciente continue em intubação e autorizado no TCLE, serão analisadas células amostras de três coletas de aspirado traqueal. Primeira coleta entre o primeiro e terceiro dia de internação, segunda coleta entre o sétimo e oitavo dia de internação e terceira coleta entre o décimo segundo e décimo quinto dia de internação.

Os resultados das análises dessas amostras serão relacionados com outros parâmetros como idade, resultados de exames laboratoriais e outras condições, que serão retiradas do prontuário clínico do paciente.

Riscos:

Os riscos são inerentes aos procedimentos da rotina de aspiração. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais treinados e habilitados, seguindo os protocolos de atendimento e de realização dos testes. Esses procedimentos já são realizados no paciente internado. Diante de eventuais danos, comprovadamente provenientes da pesquisa, o responsável poderá pleitear indenização.

Benefícios:

O benefício da participação do paciente que você é responsável, nessa pesquisa, será contribuir para o entendimento do desenvolvimento da imunidade contra infecções, assim como para a geração de novas terapias. A participação na pesquisa é voluntária.

Outras Considerações:

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa. Você e o paciente não terão nenhum custo para participação na pesquisa.

Confidencialidade:

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, e com anuência do Hospital Universitário de Canoas, a fim garantir que seus direitos e bem-estar sejam protegidos. Os dados coletados durante a pesquisa serão tratados de forma confidencial e serão utilizados unicamente com fins científicos e apresentados para o Ministério da Saúde. Fica garantido de que em momento algum o nome dos participantes será divulgado. Todas as informações coletadas irão respeitar o sigilo de confidencialidade de dados.

Se você tiver dúvidas sobre este estudo, pode entrar em contato com o pesquisador responsável “Dr. Luiz Carlos Rodrigues Junior, Endereço: Rua Sarmento Leite, 245 – Porto Alegre/RS – UFCSPA, prédio 3, laboratório de imunoterapia (813). Telefone: (51) 3303-8874, luizcrj@ufcspa.edu.br”. Caso haja alguma dúvida sobre seus direitos como participante de pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, localizado na Av. Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17 - Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar - Bairro Centro Histórico, Porto Alegre/RS, (51) 3214 8571, cep@santacasa.tche.br, Segunda a sexta das 9h às 12h e das 13:30h às 17h ou CEP/UFCSPA Rua Sarmento Leite, 245 – Porto Alegre Sala 605, prédio 3 Telefone 51 3303-8804 Email: cep@ufcspa.edu.br Horário de Atendimento ao público: 08:00 às 12:00 horas / 13:00 às 17:00 horas.

Este termo é assinado em duas vias, sendo uma para o pai ou mãe do paciente e outra para os pesquisadores. Ao assinar, você confirma a participação do paciente na pesquisa, indicando que entendeu as informações fornecidas, os procedimentos do estudo e que teve a oportunidade de fazer perguntas e tirar dúvidas sobre o que foi lido e explicado.

Por favor, marque com um X:

Eu concordo com a coleta de aspirado traqueal?

() NÃO () SIM

Eu concordo com a coleta sequencial de mais duas amostras?

() NÃO () SIM

Assinaturas:

RESPONSÁVEL PELO PACIENTE:

Nome completo:

Assinatura: _____ Data:

Nome do paciente: _____ Nº do prontuário:

PESQUISADOR QUE APLICOU O TERMO:

Nome completo:

Assinatura: _____

Cidade: _____ Data: _____

Anexo 6

PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS – PROVIRI

1) Dados do paciente:

- 1.1) Nome: _____
- 1.2) Registro: _____ 1.3) Telefone contato: _____
- 1.4) Data de nascimento: ____/____/200__
- 1.5) Endereço: _____
- 1.6) Cidade: _____ 1.7) Data internação: ____/____/200__
- 1.8) Peso na internação: ____, __ Kg
- 1.9) Hospital de Recrutamento: _____
- 1.10) Unidade: 1-☐Emergência 2-☐Internação 3-☐CTI Pediátrica

2) Tratamento na internação

- 2.1. Medicações em uso 1-☐Beta-2 2-☐Corticóide oral 3-☐Corticóide EV
4-☐Antibiótico **(Se não estiver em uso de antibiótico, pular para 3)**
- 2.2) Qual antibiótico? _____
- 2.3) Via: 1-☐EV 2-☐VO
- 2.4) Antibiótico iniciado nesta internação: 1-☐sim
2-☐uso anterior à chegada ao Serviço

3) História Familiar:

	Pai	Mãe	Irmãos
3.1) Asma	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não
3.2) Rinite alérgica	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não
3.3) Eczema atópico	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não
3.4) Tabagismo	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não
3.5) Tabagismo na gestação	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não	1- ☐ sim 2- ☐ não

4) História pregressa:

- 4.4) Internação prévia: 1-☐sim 2-☐não
Se sim, motivo principal: _____
- 4.5) História pessoal de rinite alérgica: 1-☐sim 2-☐não
- 4.6) História de “alergia de pele”: 1-☐sim 2-☐não
- 4.7) História de chiado no peito: 1-☐sim 2-☐não
- 4.8) Uso prévio de aerolin ou berotec: 1-☐sim 2-☐não
- 4.9) Uso recente de antibiótico: 1-☐sim 2-☐não
- 4.10) Vacinação para Influenza: 1-☐sim 2-☐não 3-☐não sabe
- 4.11) Paciente Pediátrico
Aleitamento materno: 1-☐sim 2-☐não
- 4.12) Se sim, exclusivo 1- ☐ ou 2- ☐ em desmame

Se sim, por quanto tempo: _____.

5) Clínica:

- 5.1) F.R.: ____ rpm 5.2) FC: ____ bpm 5.3) Sat. O2: ____ %
5.4) Uso de O2: 1-☐sim 2-☐não 5.5) Tiragem: 1-☐sim 2-☐não
6.1) Hemoglobina: ____ 6.2) Hematócrito: ____ %
6.3) Leucócitos totais: ____
6.4) Neutrófilos: ____ % 6.5) Bastonados: ____ % 6.6) Linfócitos: ____ %
6.7) Monócitos: ____ % 6.8) Eosinófilos: ____ % 6.9) Mielócitos: ____ %
6.10) Metamielócitos: ____ % 6.11) Plaquetas: ____
6.12) Granulações tóxicas em neutrófilos: ____ 1-☐sim 2-☐não

7) Imunofluorescência para Vírus realizada: 1-☐sim 2-☐não

Resultado positivo:

- 7.1) VSR 1-☐sim 2-☐não
7.2) Influenza 1-☐sim 2-☐não
7.3) COVID-19 1-☐sim 2-☐não
7.4) OUTRO: ____ 1-☐sim 2-☐não

8. PCR para vírus: 1-☐sim 2-☐não

Resultado positivo:

- 8.1) COVID-19 1-☐sim 2-☐não
8.2) OUTRO: ____ 1-☐sim 2-☐não

2) Tratamento na internação

- 2.1) Dias de internação: ____ 2.2) Dias em uso de O2: ____
2.3) Dias internado(a) em CTIP: ____
2.4) Dias em VM: ____ dias
2.5) Sibilância até que data: ____/____/____
2.6) Dias de uso de antibiótico: ____ 1-☐EV 2-☐VO
2.7) Qual antibiótico? _____
2.8) Uso de corticóide sistêmico? 1-☐sim 2-☐não
2.9) Uso de beta-2? 1-☐sim 2-☐não
2.10) Tempo de uso de O2 suplementar: ____ horas

Alterações radiológicas:

- 1) Exame normal 1-☐sim 2-☐não
2) Opacidade alveolar
 2.1) amorfa 1-☐sim 2-☐não
 2.2) redonda 1-☐sim 2-☐não
 2.3) 1-☐segmentar
 2-☐lobar
 3-☐pulmonar
 Local: _____
3) 3a. Infiltrado (tipo)

- 1-☐ infiltrado intersticial reticular
- 2-☐ infiltrado intersticial retículo-nodular
- 3b. Infiltrado (local)
 - 1-☐ infiltrado central simétrico bilateral
 - 2-☐ infiltrado intersticial difuso
 - 3-☐ infiltrado intersticial unilateral
- 4) Derrame pleural
 - 1-☐ unilateral
 - 2-☐ bilateral
 - Espessura: _____
 - 2-☐ infiltrado intersticial retículo-nodular
- 6) Atelectasia
 - 1-☐ pulmonar
 - 2-☐ lobar
 - 3-☐ segmentar
 - 4-☐ subsegmentar
- 7) Linfonodomegalia 1-☐ sim 2-☐ não
- 8) Consolidação 1-☐ sim 2-☐ não
- 9) Infiltrado 1-☐ sim 2-☐ não
- 10) Consolidação + infiltrado 1-☐ sim 2-☐ não
- 11) Derrame pleural 1-☐ sim 2-☐ não



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

Editais PROPPG nº 24 /2023 de 16 de janeiro de 2023

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

**OBTENÇÃO DE GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DO PERMEADO
DO SORO DE LEITE E APLICAÇÃO EM KOMBUCHA**

Prof^a. Dr^a. Manuela Poletto Klein - UFCSPA

Mestrando Felipe Heinrich de Oliveira - PPGNutri

PORTO ALEGRE

2023

1. RESUMO

Alimentos prebióticos e/ou probióticos são considerados alimentos funcionais em virtude dos benefícios à saúde que geram ao consumidor além das propriedades nutricionais básicas. Enquanto os probióticos denotam o consumo de produtos que contenham os microrganismos vivos em quantidade significativa, os prebióticos designam o consumo de fibra não digeríveis que estimulam seletivamente a atividade de bactérias benéficas no intestino. Dentre os prebióticos, estão os galacto-oligossacarídeos, carboidratos que contém de duas a cinco moléculas de galactose e uma de glicose, e que são sintetizados a partir da reação enzimática de transgalactosilação, por ação da enzima β -galactosidase, em presença de alta concentração de lactose. Em virtude da larga produção da indústria de laticínios no Rio Grande do Sul, seus subprodutos como o permeado de soro de leite são uma ótima fonte de lactose de baixo custo, sendo interessante também para a indústria que pode destinar um subproduto que seria descartado. O consumo de fibras prebióticas está associado a melhora do sistema imunológico, redução de bactérias patogênicas, produção de ácidos graxos de cadeia curta e melhora do funcionamento do sistema digestivo. Além disso, gera benefícios ao sistema nervoso e cardiovascular do indivíduo. Os galacto-oligossacarídeos já são aplicados na indústria alimentícia para o desenvolvimento de alimentos funcionais em virtude de suas facilidades tecnológicas, e a adição conjunta com probióticos gera o conceito de alimento “simbiótico”, gerando apelo de maior benefício à saúde. A kombucha, bebida viva composta de microrganismos probióticos, sendo adicionada de fibras prebióticas, no caso os galacto-oligossacarídeos, pode resultar em um produto de alto apelo funcional, bem como incrementar a atividade probiótica da bebida. Diante desse contexto, o principal objetivo desse trabalho é desenvolver uma bebida funcional prebiótica, adicionada de galacto-oligossacarídeos sintetizados a partir da lactose do permeado do soro de leite. Além disso, busca-se avaliar o comportamento da fermentação da kombucha adicionada do prebiótico em foco.

PALAVAS-CHAVE: galacto-oligossacarídeos; kombucha, prebióticos, funcional.

2. DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

Executor do projeto

Prof^a. Dr^a. Manuela Poletto Klein

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Curso Superior de Tecnologia em Alimentos

Local de Execução

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre - CEP 90050-170 - RS – Brasil

Equipe de alunos e pesquisadores que participam do projeto

Mestrando:

Felipe Heinrich de Oliveira, graduação em Tecnologia em Alimentos (UFCSPA), mestrado em andamento no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGNut - UFCSPA).

Colaboradores e pesquisadores científicos:

Prof^a. Dr^a. Poliana Deyse Gurak

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Curso Superior de Tecnologia em Alimentos

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Curso Superior de Engenharia de Alimentos

3. CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

Alimentos funcionais são aqueles que alegam benefícios à saúde do consumidor além das funções nutricionais básicas, podendo fazer menções à preservação da saúde e também à redução do fator de risco a doenças (1). Alguns dos alimentos que possuem alegação de propriedade funcional são os chamados probióticos, os quais devem conter “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do consumidor” (2), e também os prebióticos, que geralmente são oligossacarídeos fermentáveis não digestíveis que, quando consumidos, estimulam seletivamente o crescimento dos microrganismos probióticos (3,4).

Um exemplo de composto prebiótico são os galacto-oligossacarídeos (GOS). Estes oligossacarídeos contêm de duas a cinco moléculas de galactose e uma de glicose, unidas por ligações glicosídicas. Podem ser lineares ou ramificados, com grau de polimerização de 2 a 8, e podem ser obtidos a partir da reação de transgalactosilação, por ação da enzima β -galactosidase, em presença de uma solução concentração de lactose (5–7).

Para a produção de galacto-oligossacarídeos, a lactose pode ser obtida de forma econômica e sustentável a partir da indústria de laticínios, que gera uma grande quantidade deste resíduo orgânico diariamente, os quais, se não devidamente destinados, podem trazer riscos para o meio-ambiente em virtude de sua alta demanda bioquímica de oxigênio, tornando-se altamente poluente (8). Subprodutos como o soro de leite e seu permeado são ricas fontes de lactose e que podem oferecer o insumo em larga escala no Rio Grande do Sul.

O consumo de fibras prebióticas está diretamente relacionado com o crescimento seletivo de populações microbianas presentes naturalmente na microbiota intestinal, principalmente dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, os quais estão associados à promoção da saúde humana através da melhora do sistema imunológico, redução de bactérias patogênicas, produção de ácidos graxos de cadeia curta e melhora do funcionamento do sistema digestivo (9–11)

O aumento da absorção de cálcio e da densidade mineral óssea é um dos apelos da ingestão de prebióticos, como mostrou um estudo com 100 jovens adolescentes submetidos a dieta rica em fruto-oligossacarídeos (12). O consumo de prebióticos também está associado à melhora dos sintomas da síndrome do intestino irritável e da doença de Crohn, com potencial diminuição do risco de câncer colorretal através de produtos da fermentação prebiótica como o butirato, otimização do sistema imunológico via diminuição das populações bacterianas nocivas, melhora do humor, das funções cognitivas e da memória. Destaca-se também os efeitos positivos sobre a pele, sua prevenção e diminuição da gravidade de alergias como dermatite atópica e melhora dos seus aspectos, como brilho e elasticidade. Potenciais efeitos positivos sobre o sistema cardiovascular são relatados através da ação indireta sobre os níveis de colesterol, redução da glicose pós-prandial e consequente diminuição do risco de síndrome metabólica (4,7,9,13). Além disso, foi constatado, por indivíduos submetidos ao consumo de produtos adicionados de prebióticos, o alívio da constipação e a melhora dos “hábitos intestinais”, caracterizados pela frequência de evacuação, quantidade e consistência das fezes e a facilidade de evacuação (9).

Por conter alta solubilidade, estabilidade e ausência de sabor, os galacto-oligossacarídeos são largamente utilizados na indústria alimentícia. As fórmulas infantis são muito visadas para a aplicação de GOS em virtude de o leite materno contê-los naturalmente. A fibra também pode ser aplicada em pães para produzir um alimento prebiótico, ou empregado como substituto de açúcar e gordura em chocolate e sorvetes, respectivamente (7,14).

Neste sentido, há também os chamados alimentos simbióticos, termo esse que designa a junção de prebióticos com probióticos. Essa coesão tem o propósito de, através das fibras, estimular seletivamente microrganismos benéficos e promover sua sobrevivência no trato gastrointestinal. Sua combinação também implica em uma possível eficácia elevada em comparação a pre- ou probióticos consumidos isoladamente, conferindo assim um efeito benéfico à saúde do consumidor (15,16)

A kombucha é uma bebida que contém microrganismos vivos, e gera um apelo comercial de bebida funcional probiótica, embora esta alegação não seja consenso na literatura científica (17). O perfil de microrganismos presentes na bebida é muito amplo, sendo composto por bactérias acéticas, lácticas e leveduras (17). Comercialmente, a maioria das kombuchas é apresentada como uma bebida viva, isto é, não submetida a tratamentos de conservação que eliminariam os microrganismos. Assim, a adição de fibras prebióticas na kombucha pode gerar maior apelo funcional, além de estimular a atividade de microrganismos probióticos.

Levando em consideração que não foi encontrado artigos em bases de dados com os termos de busca “application”, “galactooligosaccharides” e “kombucha” e outras combinações semelhantes, e que não há estudos que mostrem o comportamento dos galacto-oligossacarídeos em um meio como o da kombucha, bem como os comportamento dos microrganismos naturalmente presentes na bebida fermentada, esse projeto visa desenvolver uma kombucha prebiótica através da adição de galacto-oligossacarídeos produzidos a partir do permeado do soro do leite, bem como avaliar a fermentação com a adição do prebiótico.

4. OBJETIVOS

O **objetivo geral** deste projeto é aplicar galacto-oligossacarídeos em kombucha e avaliar a bebida durante a fermentação e ao longo da sua vida-de-prateleira.

4.1 Objetivos específicos:

4.1.1. Obtenção dos GOS

- Sintetizar os GOS a partir de uma solução concentrada de permeado do soro de leite utilizando a enzima beta-galactosidase;
- Quantificar os GOS produzidos;

4.1.2. Produção da kombucha

- Preparar o chá e fermentar a bebida a ser utilizada no projeto;

4.1.3. Aplicar os GOS em kombucha

- Aplicar GOS durante a fermentação, em diferentes concentrações;
- Aplicar GOS na kombucha pronta para o consumo, em diferentes concentrações;

4.1.4. Avaliar a bebida na fermentação e ao longo da vida de prateleira

- Quantificar os GOS e outros açúcares durante o período de fermentação;
- Quantificar os GOS, na bebida pronta armazenada sob refrigeração, em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 dias).
- Quantificar sacarose, frutose e glicose nas amostras durante a fermentação e durante sua vida-de-prateleira;
- Avaliar o pH e acidez titulável das amostras durante a fermentação e durante a vida-de-prateleira da kombucha;
- Realizar a contagem de bactérias lácticas logo após a fermentação e durante a vida-de-prateleira da kombucha.

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção enzimática dos galacto-oligossacarídeos utilizando o permeado de soro de leite como substrato

5.1.1. Preparação de β -galactosidase imobilizada em esferas de quitosana

A β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* será imobilizada covalentemente em esferas de quitosana ativadas com genipina, conforme descrito em trabalho anterior (18).

5.1.2. Atividade de β -galactosidase livre e imobilizada

A atividade de β -galactosidase será avaliada incubando a enzima diluída (50 μ L) com 0,5 mL de tampão 0.1 M de acetato de sódio (pH 4,5) de atividade contendo ONPG (15 mM) a 37 °C durante 2 min. Para β -D-galactosidase imobilizada, 1,5 mg (suporte seco) será incubado com 1 mL de tampão de atividade contendo ONPG (10 mM) a 37 °C durante 2 min. As reações serão interrompidas com a adição de tampão borato pH 9,8. O o-nitrofenol (ONP) liberado será determinado espectrofotometricamente a 415 nm. Uma unidade de atividade de β -D-galactosidase (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de ONPG a o-nitrofenol por minuto nas condições previamente indicadas. O teor de proteína das soluções enzimáticas foi determinado pelo ensaio de Bradford.

5.1.3. Síntese contínua de galacto-oligossacarídeos em reator de leito fixo

O reator de leito fixo do tipo coluna (12 x 3 cm) será composto por uma coluna de vidro com camisa d'água, controlador de vazão e banho-maria. O reator será adicionado com 4 g (peso seco) de esferas de 2 mm de diâmetro de β -galactosidase imobilizadas nas esferas de quitosana. A solução de permeado do soro de leite equivalente a 400 g/L de lactose será alimentada de forma ascendente através da coluna usando uma bomba peristáltica. As vazões serão testadas de 1 a 15 mL min⁻¹ para síntese de GOS a 37 °C. As amostras serão coletadas após atingir o estado estacionário e o produto da reação será analisado por HPLC.

5.2. Quantificação de galacto-oligossacarídeos e outros açúcares por HPLC

Os galacto-oligossacarídeos e os outros açúcares (sacarose, frutose, galactose e glicose) serão analisados por HPLC (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com índice de refração e coluna Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm). Água ultrapura será utilizada como solvente eluente na vazão de 0,6 mL min⁻¹, a 85 °C. A concentração de sacarídeos será calculada por interpolação de padrões externos. A concentração de GOS será calculada como equivalentes de rafinose a partir de um padrão externo de rafinose, conforme descrito por Gosling et. al. (2011).

5.3. Obtenção da kombucha

Será realizada uma infusão de chá verde (*Camellia sinensis*) na concentração de 2 g/L, por 10 min à 80°C. Então, sacarose (40 g/L) será misturada ao chá. O chá será resfriado a 30°C, e adicionado de 10% do volume total de “*starter liquid*” (SCOBY), para iniciar a fermentação. O recipiente será coberto com um pano para impedir a contaminação por insetos e para permitir o contato do meio com o oxigênio. Ao longo de 10 dias serão coletadas amostras para medição de pH até o momento no qual a kombucha está ideal para o consumo (pH 3-3.5). Antes do armazenamento, GOS será adicionado à kombucha nas concentrações de 25 g/L, 30 g/L e 40 g/L.

5.4. Fermentação da kombucha em presença de GOS

A influência da presença de GOS na cinética de fermentação será avaliada. Para isso, será preparada uma kombucha para fermentação (grupo controle) com apenas adição de sacarose (40 g/L) e outro de preparo idêntico, porém com a adição de mais 10 g/L de GOS. A fermentação será acompanhada por 30 dias, e amostras serão analisadas para quantificação de GOS e outros açúcares em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 20, 25 e 30 dias), via HPLC (ver item 5.2).

5.5. Determinação do pH e acidez titulável

Em todos os momentos de coleta de amostra, serão colhidos dados de pH e acidez titulável. Para medir pH, será usado pHmetro de Bancada Hanna Edge, modelo HI2002-02. A acidez titulável se fará com o uso de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N e Solução alcoólica de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄) a 1 % (m/v).

5.6 Contagem de bactérias lácticas

As amostras líquidas serão diluídas diretamente com 40 mL de tampão de sal de triptona e depois misturadas por 2 min. Para numerar a contagem total de bactérias aeróbicas, os homogeneizados serão diluídos em série e semeados em placa de ágar de contagem (AES, França) e então incubados por 72 h a 30°C. Bactérias lácticas serão enumerados utilizando o meio De Man Rogosa Sharpe (MRS) (AES, França) acidificado com 10% (v/v) de ácido cítrico a pH 4,8 e suplementado com 0,1 g/L de pimaricina para inibir o crescimento de levedura; as placas serão incubadas a 30°C sob condições anaeróbicas por 72–96 h. Para cada placa de Petri e em cada data de amostragem, as colônias serão selecionadas de acordo com sua morfologia de colônia e, em seguida, a avaliação microscópica por coloração de Gram (bactérias) ou coloração com azul de

metileno (levedura) e/ou determinações de catalase e oxidase foram realizadas a fim de selecionar isolados representativos para cada grupo microbiano. Em geral, em placas com 50 a 300 colônias, será analisado um número de colônias correspondente à raiz quadrada de cada tipo morfológico. Em relação às análises de contagem de placas, os potenciais de crescimento também foram calculados para cada grupo microbiano usando a fórmula $A_j = \log(D_8) - \log(D_0)$, onde A_j é o valor do potencial de crescimento e D é o dia da análise, para determinar como os grupos microbianos evoluíram durante a fermentação (no total, 92 isolados LAB, 204 isolados AAB e 127 isolados de levedura) (Coton et al., 2017).

6. ETAPAS DE EXECUÇÃO E CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Este projeto está organizado para ser desenvolvido em 18 meses (com início em junho de 2023), assim distribuído:

Atividades	Distribuição Temporal (BIMESTRES)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Síntese de galacto-oligossacarídeos	x	x										
Preparo da kombucha		x										
Aplicação do GOS em kombucha		x										
Fermentação		x										
Estudo de vida de prateleira		x	x	x	x	x						
Contagem de GOS		x	x	x	x	x						
Contagem bactérias lácticas		x	x	x	x	x						

Produção de relatórios, publicação de trabalhos							X	X	X	X	X	X

7. PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DA EXECUÇÃO DO PROJETO

Com este projeto, se espera ampliar a base de conhecimento sobre aplicação dos galacto-oligossacarídeos em alimentos, visando fomentar tanto alternativas para destino de subprodutos da indústria de laticínios quanto caminhos para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Espera-se desenvolver um alimento funcional estável estabilidade tanto em relação ao seu conteúdo de fibras prebióticas e microrganismos potencialmente probióticos.

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

Do ponto de vista técnico-científico os resultados obtidos permitirão tirar conclusões a respeito do impacto dos galacto-oligossacarídeos nos microrganismos presentes na kombucha, bem como nas características físico-químicas da bebida, durante o processo fermentativo e durante a sua vida-de-prateleira. Do ponto de vista de inovação, haverá o desenvolvimento de um novo produto funcional, que será a kombucha adicionada de galacto-oligossacarídeos, os quais apresentam efeitos benéficos à saúde largamente documentados na literatura. Do ponto de vista de difusão, haverá a divulgação dos resultados obtidos através de apresentações em eventos, mostra da UFCSPA e publicação científica. Além disso, os resultados poderão ser repassados à empresas interessadas, mediante acordos específicos.

9. REFERÊNCIAS

1. ANVISA AN de VS. Guia para avaliação de alegação de propriedade funcional e de saúde para substâncias bioativas presentes em alimentos e suplementos alimentares. 2021;1–60. Available from: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6358888/Guia+55_2021_versão+1+de+25+11+2021.pdf/3e7d36b7-c14f-4feb-8028-041fb2fe78ac

2. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.
3. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017;14(8):491–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
4. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2023 Jan 21];104(S2):S1–63. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114510003363/type/journal_article
5. Pruksasri S, Supee K. Sensory evaluations and stability determinations of goat milk containing galactooligosaccharides. *Int J Food Sci Technol*. 2013;48(12):2456–62.
6. Souza AFC e., Gabardo S, Coelho R de JS. Galactooligosaccharides: Physiological benefits, production strategies, and industrial application. *J Biotechnol*. 2022;359(October):116–29.
7. Wang K, Duan F, Sun T, Zhang Y, Lu L. Galactooligosaccharides: Synthesis, metabolism, bioactivities and food applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2023;0(0):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2164244>
8. Mano MCR, Paulino BN, Pastore GM. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Res Int* [Internet]. 2019;124(April 2018):78–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>
9. Pimentel TC, Torres de Assis BB, dos Santos Rocha C, Marcolino VA, Rosset M, Magnani M. Prebiotics in non-dairy products: Technological and physiological functionality, challenges, and perspectives. *Food Biosci* [Internet]. 2022;46(November 2021):101585. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101585>
10. Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr*. 2005;93(S1):S13–25.
11. Slavin J. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013;5(4):1417–35.

12. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Liang L, Gunn SK, Darlington G, et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(2):471–6.
13. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, et al. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods.* 2019;8(3):1–27.
14. Balthazar CF, Silva HLA, Cavalcanti RN, Esmerino EA, Cappato LP, Abud YKD, et al. Prebiotics addition in sheep milk ice cream: A rheological, microstructural and sensory study. *J Funct Foods [Internet].* 2017;35:564–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.004>
15. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401–12.
16. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 2017;9(9).
17. Sengun IY, Kirmizigul A. Probiotic potential of kombucha. *Journal of Functional Foods.* Elsevier Ltd; 2020.
18. Klein MP, Hackenhaar CR, Lorenzoni ASG, Rodrigues RC, Costa TMH, Ninow JL, et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydr Polym.* 2016;137:184–90.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Coordenadora Márcia Rosângela Wink

Agosto de 2018

Título do projeto: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Coordenação

Profa. Dra. Márcia Rosângela Wink
Laboratório de Biologia Celular
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Local de Realização

Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA

Instituições envolvidas e Unidades Executoras

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Laboratório de Biologia Celular
Rua Sarmiento Leite, 245, Centro - Porto Alegre CEP
90050-170 – Rio Grande do Sul – Brasil Fone: (51) 3303-8823
– fax: (51) 3303-8810

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA)
Banco de Tecidos (Pele) - ISCOMPA
Banco de córneas - ISCOMPA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Medicina Regenerativa	4
1.2 Biomateriais	4
1.3 Aplicação das células humanas em Medicina Regenerativa	5
1.4 Tecido adiposo	5
1.5 Pele humana	6
1.5.1 Derme	6
1.5.2 Epiderme	6
1.6 A córnea humana	8
1.6 .1 Epitelio córneo	8
1.6.2 Limbo esclero-corneal	9
1.7 Cordão umbilical	10
1.8 Membrana amniótica	10
1.8.1 Membrana Amniótica na regeneração de lesões cutâneas	12
2 JUSTIFICATIVA	13
3 ASPECTOS ÉTICOS	13
4 OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo Geral	13
4.2 Objetivos Específicos	13
5 MATERIAIS E MÉTODOS	14
5.1 Isolamento, caracterização e cultivo das células estromais mesenquimais (MSCs) do tecido adiposo	14
5.2 Processamento da Membrana Amniótica	15
5.3 Extração, caracterização e cultivo de células endoteliais e mesenquimais do cordão umbilical	15
5.4 Isolamento e cultura de queratinócitos, melanócitos e células mesenquimais humanas oriundas de pele de descarte e limbo esclero-corneal	16
5.5 Determinação da atividade da LDH	17
5.6 Método de exclusão com azul de Tripan	18
5.7 Análise da viabilidade celular (MTT)	18
5.8 Análise de genotoxicidade (ensaio cometa alcalino)	19
5.9 Coloração dos filamentos de actina	19
5.10 Análise da morfometria nuclear e da densidade	19
5.11 Análise por microscopia eletrônica	20
6 ORÇAMENTO	20
7 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 INTRODUÇÃO

1.1 Medicina Regenerativa

A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências biomédicas para promover a regeneração ou substituição de tecidos e órgãos danificados pela idade, doenças, traumas ou malformações congênitas. Este campo engloba muitas estratégias, incluindo o uso de biomateriais e q novas células geradas, para substituir o tecido perdido, estruturalmente e funcionalmente, ou para contribuir com a cicatrização do mesmo (Mao & Mooney, 2015).

1.2 Biomateriais

O American National Institute of Health (NIH), instituto de pesquisa norte americano, define biomaterial como qualquer substância ou combinação destas, que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usada por qualquer que seja o período de tempo, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de manter e ou alterar a qualidade de vida do indivíduo (BHAT, 2002). Os primeiros biomateriais foram utilizados pelos povos egípcio e romano, os quais reparavam defeitos cranianos com ouro e marfim (BERGMANN; STUMPF, 2013). Atualmente, cerâmicas, polímeros e metais são os mais utilizados em implantes (BHAT, 2002; MORAVEJ; MANTOVANI, 2011a).

Os biomateriais podem ser classificados em três categorias, conforme a interação que ocorre com o tecido corporal, sendo: materiais biotolerantes, bioativos e bioinertes (HERMAWAN, 2012). Os materiais biotolerantes não são rejeitados quando implantados no tecido vivo, eles são envolvidos por uma camada de tecido fibroso em forma de cápsula, formado principalmente por colágeno e fibroblastos. Os materiais bioinertes não induzem o corpo a reagir contra o corpo estranho. Em contraste, os materiais bioativos permitem a interação direta do biomaterial com o tecido, estimulando

ou retardando funções celulares específicas, o que permite implementar ainda mais o tratamento almejado (SYKARAS et al., 2000).

1.3 Aplicação das células humanas em Medicina Regenerativa

Materiais de descarte humano como tecido adiposo, pele, limbo esclero-corneal, cordão umbilical e membrana amniótica possuem grande potencial para serem usados na medicina regenerativa, uma vez que são fontes de células que podem ser combinadas a biomateriais e utilizadas para avaliar sua citotoxicidade, fazendo assim a triagem necessária para avaliação da possibilidade de posterior análise *in vivo*.

1.4 Tecido adiposo

Embora MSCs derivadas de diferentes tecidos apresentem características biológicas básicas, algumas diferenças já foram observadas, como o potencial de expansão em meio de cultivo e as propriedades funcionais relacionadas à idade do tecido. Assim, é necessário determinar a fonte apropriada de MSCs para aplicações clínicas futuras (Si *et al*, 2011). Entre outras fontes, o tecido adiposo é considerado uma das principais fontes de MSCs com vistas à engenharia de regeneração tecidual, por sua facilidade de obtenção e em quantidades adequadas. Além disso, o potencial proliferativo e de diferenciação das MSCs derivadas de tecido adiposo são semelhantes ao observado nas MSCs de medula óssea (Mizuno, 2009).

Nos dias atuais, uma variedade de biomateriais estão sendo investigados, associados a MSCs, para aplicação na medicina regenerativa. Estratégias de engenharia de tecidos combinam as células como scaffolds, buscando desenvolver substitutos biológicos que possam restaurar as funções teciduais. Em geral, as terapias baseadas em células-tronco e conceitos da engenharia de tecidos providenciam promissoras possibilidades. No entanto, devem ser investigadas cautelosamente e criticamente para fornecer uma terapia segura e eficaz (KHADEMHOSEINI; VACANTI; LANGER, 2009).

1.5 Pele humana

A pele não é apenas o maior órgão do corpo, é também um dos mais complexos, com pelo menos cinco tipos diferentes de células que contribuem para a sua estrutura, e outros tipos de células do sistema circulatório e imunológico. Uma de suas principais funções é a proteção, como defesas físicas, químicas, imunológicas, patogênicas, radiação UV e radicais livres (Chuong et al., 2002).

É constituída por uma camada superficial, a epiderme, composta principalmente por queratinócitos, e uma camada mais profunda, a derme, composta por elementos de tecido conjuntivo. A inter-relação harmônica entre estas camadas, mantém a homeostase do órgão mais importante na proteção do organismo contra agentes de agressão ambiental (Huang et al., 1998).

1.5.1 Derme

A derme é composta de elementos que formam a matriz extracelular, tais como o colágeno, a elastina e os glicosaminoglicanos. A derme é altamente vascular, e também inclui as unidades pilos sebáceo, glândulas sudoríparas, células dérmicas adiposas, mastócitos, e leucócitos infiltrantes (Menon, 2002).

1.5.2 Epiderme

A superfície da pele é coberta pela epiderme, um epitélio escamoso estratificado dedicado para a formação de um estrato córneo altamente impermeável (Suter *et al.*, 1997). A epiderme estratificada é divisível em quatro camadas distintas: o estrato basal, estrato espinhoso, camada granulosa, e do estrato córneo (Figura 1).

Os queratinócitos são responsáveis pela produção da barreira de proteção e compreendem 85% das células na epiderme. As células de Langerhans (8-5% do total de células epidérmicas) constituem um importante papel na resposta imunitária contra

antígenos que entram através da pele. O melanócitos (8-5% da população total) são as células produtoras de pigmentos e as células de Merkel, são mecanorreceptores e servem funções táteis.

Os queratinócitos definem a estrutura e organização da epiderme através da sua capacidade de diferenciação terminal programada. Eles estão dispostos em camadas sobrepostas, as quais são indicativos do seu estado diferenciado. A camada basal dos queratinócitos é a camada proliferativa menos diferenciada. Com o aumento da diferenciação, os queratinócitos migram e quando alcançam a área superior da camada granular sofrem um tipo de morte celular programada.

Os melanócitos representam uma parte pequena da população de células da epiderme (Frenk & Schellhorn, 1969). A pigmentação cutânea é o resultado de dois importantes eventos: a síntese de melanina pelos melanócitos e a transferência de melanossomas para os queratinócitos circundantes (Fitzpatrick & Szabo, 1959). Os melanócitos fazem a transferência dos melanossomas para os queratinócitos através de seus dendritos, onde formam as capas de melanina que reduzem os danos no DNA induzidos por UV na epiderme humana (Fitzpatrick & Breathnach, 1963).

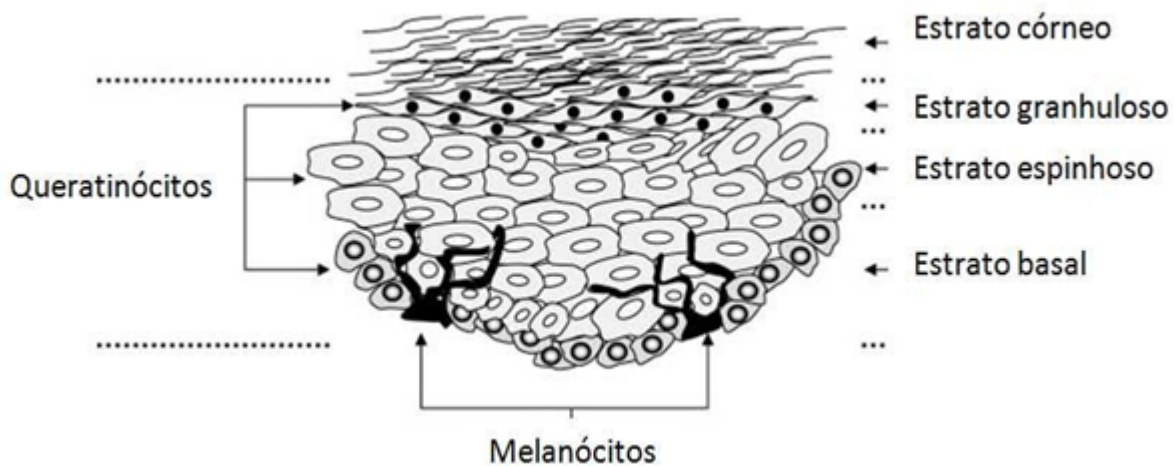


Figura 1. As camadas da epiderme. (Adaptada de Robins, 1991).

1.6 A córnea humana

A córnea é um tecido avascular transparente que proporciona proteção e propriedades de refração da estrutura interna do olho, essencial para a acuidade visual (Daniels *et al.*, 2001). A córnea fornece três quartos do poder de refração do olho humano, permitindo a transmissão de luz para a retina. Também atua como uma barreira física que protege as estruturas oculares internas dos agentes externos, que podem ser físicos, químicos, patogênicos ou microbianos geralmente (Katz, 1989; Kolozsvari *et al.*, 2002). Além disso, a sua capacidade de absorver os comprimentos de onda da radiação ultravioleta proporciona propriedades de fotoproteção (Lanza, 1997).

A córnea é composta de cinco membranas conhecidas como o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e do endotélio.

1.6 .1 Epitélio córneo

A membrana externa da córnea é caracterizada por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado e 5-6 camadas de células epiteliais. O epitélio representa aproximadamente 10% da espessura da córnea e atua como uma barreira para a defesa da infecção, e cria uma superfície lisa e hidratante para o lacrimal, controla a difusão de água e de solutos, enquanto absorve oxigênio e nutrientes (Pfister, 1973 ; Daniels *et al.*, 2001). As células epiteliais da superfície formam duas ou três camadas de células escamosas ligadas por junções apertadas, que além de aumentar a integridade mecânica das camadas de células, impedem a difusão de água para o estroma. Na região central são duas a três camadas de células alares, os quais se ligam à superfície da célula com junções, no entanto, estas são menos achatadas. Por sua vez, as células basais representam a camada mais profunda do epitélio da córnea. Estas células estão ligadas por junções de hiato e fixadas por hemidesmossomas à membrana basal, a qual tem aproximadamente 0.05 mm de espessura e consiste em colágeno do tipo IV e laminina (Lavker *et al.*, 1991,; DelMonte & Kim, 2011). O epitélio da córnea tem a capacidade de regenerar a partir da população de células tronco límbicas presentes na periferia da

córnea. As células epiteliais da córnea tem uma vida média de 7 a 10 dias, que se submetem a apoptose e dimensionamento, e isto permite a regeneração do epitélio da córnea, onde as células mais profundas substituem as células superficiais (Hanna *et al*, 1961;. Tseng, 1989).

1.6.2 Limbo esclero-corneal

A zona estreita de aproximadamente 2 mm entre a córnea e na conjuntiva bulbar, é conhecida como o limbo e representa o nicho de células tronco, que estão envolvidas na regeneração da córnea.

O limbo é uma região em que ocorrem alterações na estrutura da córnea. O epitélio é espesso, formando aproximadamente 10-12 camadas de células, ao contrário das cinco camadas da córnea central observadas.

Uma das diferenças mais notáveis entre a córnea e o limbo é a presença de vasos sanguíneos que formam parte das paliçadas de Vogt, zonas vascularizadas e inervadas localizadas no limbo (Davanger & Evensen, 1971. Goldberg *et al*, 1982), onde as células-tronco epiteliais da córnea têm sido encontradas (Tseng, 1989).. Células-tronco epiteliais da córnea encontram-se na membrana basal do limbo e o estroma limbo também proporciona um nicho para essas células, devido à secreção de fatores de crescimento e citocinas (Davanger & Evensen, 1971; Schermer *et al*, 1986; Tseng, 1989). Também o estroma do limbo estão as células tronco precursoras de queratinócitos (Nakamura *et al*, 2005; Du *et al*, 2005).

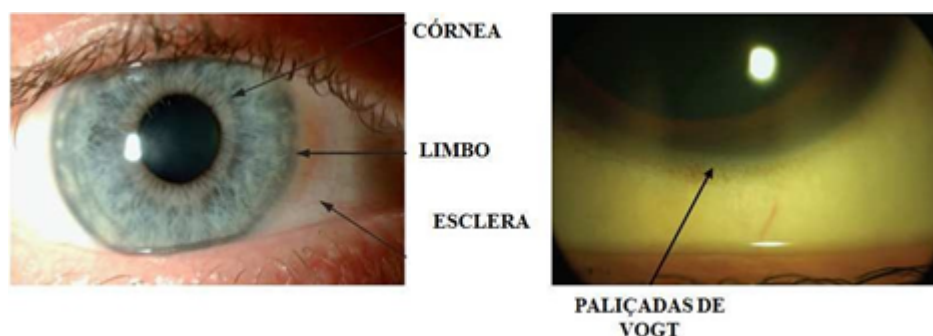


Figura 2. Limbo esclero-corneal. A) A localização do limbo é mostrado na periferia da córnea (Tomada e modificada a partir do Osei-Bempong *et al.*, 2009). B) A estrutura das paliçadas de Vogt é visível, devido à presença de melanócitos (Tomada e modificada por Fernandez *et al.*, 2008).

Além de permitir a regeneração do epitélio córneo por armazenamento de células-tronco do limbo, o limbo é caracterizado por respostas de hipersensibilidade, imunovigilância e função de barreira, impedindo as células conjuntivas de migrarem para a córnea. A resposta imunológica é produzida por células de Langerhans, que participam na ativação de linfócitos T supressores (Baum, 1970;. Higa, *et al*, 2005).

1.7 Cordão umbilical

As células endoteliais vasculares organizam-se numa monocamada celular, o endotélio, que reveste o lúmen de todos os vasos sanguíneos. Ele atua no controle de trocas gasosas a nível pulmonar, regula o fluxo de células sanguíneas circulantes e moléculas bioativas como fatores de crescimento e proteínas da coagulação. O modelo clássico para o estudo dos diferentes aspectos das funções e alterações do endotélio utiliza as Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVECs). Elas são importantes no estudo da toxicidade e trombogenicidade de stents cardiovasculares, uma vez que atuam na endotelização do vaso após a implantação da prótese (BAUDIN *et al.*, 2007; KACZMAREK *et al.*, 2010).

1.8 Membrana amniótica

Assim como a pele alógena, a membrana amniótica tem se mostrado eficaz no tratamento de grandes perdas cutâneas e tem ganhado espaço como um substituto dérmico promissor. Os resultados bastantes satisfatórios obtidos na clínica, juntamente com a elevada disponibilidade, facilidade de aceitação da doação pelas gestantes e baixo custo de manipulação tem despertado o interesse na utilização estendida deste importante recurso biológico.

A membrana amniótica é um tecido avascular que compõe a parte mais interna da membrana fetal. Histologicamente, a membrana amniótica é muito semelhante ao tecido cutâneo, tendo a mesma origem embrionária, o ectoderma (Liu *et al*, 2010). Esta é composta por uma monocamada de epitélio cúbico simples, uma membrana basal espessa (que compreende as camadas basal, compacta e de fibroblastos) e uma matriz estromal avascular ou camada esponjosa (Figura 1).

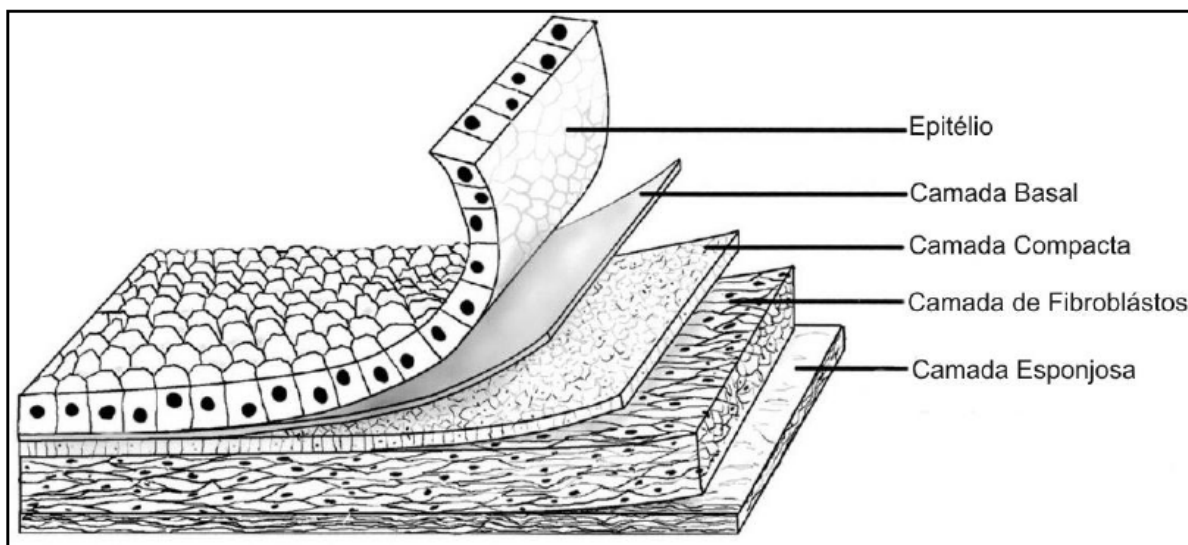


Figura 3: Histologia da membrana amniótica: monocamada epitelial (epitélio), membrana basal espessa (camadas basal, compacta e de fibroblastos) e matriz estromal avascular (camada esponjosa). (Adaptado de “*Human amniotic membrane transplantation: Past, present, and future*” John, T. *Opthalmol Clin Nor Am.* 2003; (6):43-65

O primeiro relato clínico do uso de membrana fetal como substituto dérmico no transplante de pele foi realizado por Davis em 1910 (Davis, 1910). Em 1913, Stern e Sabella descreveram o uso de membrana amniótica em superfícies corporais queimadas e com ulcerações. Observou-se nos pacientes transplantados uma redução da dor associada à ausência de infecções bacterianas (Sabella, 1913; Stern, 1913). O resultado positivo obtido com o uso de membrana amniótica levou ao seu uso continuado como curativo biológico até os dias de hoje.

Na oftalmologia, o transplante de membrana amniótica foi descrito pela primeira vez em 1940 na reparação de simbléfaro e de defeitos conjuntivais (De-Roth,

1940). Atualmente vem sendo utilizada na reconstrução da superfície ocular em substituição ao tecido conjuntival, sendo que seu emprego tem se estendido a outras áreas como no tratamento de onfalocele e na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdômen, pélvis, vagina e laringe (Kim and Tseng, 1995).

1.8.1 Membrana Amniótica na regeneração de lesões cutâneas

A caracterização da membrana amniótica ao longo dos anos levou a uma melhor compreensão a respeito da ação deste tecido na regeneração das lesões. Quando em contato com o leito da ferida, a membrana amniótica forma uma barreira física contra a invasão bacteriana, reduz a perda de fluidos corpóreos e proteínas, reduz a dor e estimula a liberação de fatores de crescimento e fatores moduladores da cicatrização que estimulam a proliferação e a migração de queratinócitos, favorecendo o processo de cicatrização (Kim and Tseng, 1995; Shimazaki *et al*, 1998). Além disso, a membrana amniótica é considerada imunologicamente apropriada para aloenxertia por expressar níveis moderados de antígenos de histocompatibilidade MHC de classe I e nenhum MHC de classe II na superfície celular. Esse fato favorece uma maior manutenção do enxerto no paciente após transplante (Wolbank *et al*, 2007; Banas *et al*, 2008). O efeito bactericida observado foi atribuído à capacidade de aderência da membrana amniótica na superfície da ferida (Talmi *et al*, 1991) ou também a uma possível restauração da microcirculação local, permitindo uma renovação acentuada de fagócitos e de fatores bacteriostáticos séricos (Rejzek *et al*, 2001). Além disso, foi demonstrada a boa capacidade da membrana amniótica na supressão do tecido de granulação, complicação bastante comum, quando em excesso, na cura de feridas cutâneas, implicando em uma menor exsudação nas feridas tratadas com essa membrana (Bigbie *et al*, 1990).

As queimaduras de espessura total não apenas destroem a barreira de proteção proporcionada pela pele, mas também os anexos dérmicos, alterando, assim, as sensações exteroceptivas originadas nos receptores periféricos da pele, como: dor, temperatura e toque. Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas com o objetivo final de restaurar a barreira protetora e de regenerar as funções sensoriais da pele. O uso de

células-tronco adultas mostrou-se bastante ativo na regeneração de órgãos e tecidos, já sendo demonstrada a eficiência da aplicação de células-tronco na reparação de nervos periféricos (Walsh and Midha, 2009). Assim, o uso de células-tronco na regeneração do tecido cutâneo é uma estratégia factível em grandes queimados e em indivíduos vítimas de traumas cutâneos.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo visa desenvolver e aprimorar procedimentos de extração e processamento de material de descarte humano hospitalar devido a necessidade de gerar terapias mais acessíveis e eficazes para o reparo tecidual. Urge então o desenvolvimento de pesquisas que visem alternativas terapêuticas nacionais e que possam ser implantadas nos sistemas já funcionantes em saúde através da utilização de ricos materiais biológicos atualmente descartados.

3 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto não possui complicações éticas além do aspecto de confidencialidade do doador do material, que será garantido pelos pesquisadores através da assinatura da Declaração de Confidencialidade do Sujeito no Estudo. Para doação dos materiais de descarte serão aplicados os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido quando necessário.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Isolar células de tecidos humanos, que seriam descartados, para estudos que gerem novas terapias com potencial uso em medicina regenerativa.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Isolar e caracterizar células estromais mesenquimais de tecidos humanos de descarte: pele, cordão umbilical, gordura e limbo esclerocorneal para serem estudadas e testadas em biomateriais utilizados em regeneração tecidual;
- 2) Isolar e caracterizar queratinócitos e melanócitos de pele humana e limbo esclerocorneal, para aplicação em biomateriais;
- 3) Isolar e caracterizar Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC) obtidas de cordão umbilical (proveniente de partos a termo) para avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de amostras de ferro, micro moldado por injeção, para uso em stents cardíacos;
- 4) Estudar *in vitro* a biocompatibilidade de metais biocorrosíveis com células estromais mesenquimais humanas (MSCs);
- 5) Avaliar a biocompatibilidade da membrana amniótica humana e de uma matriz compósita de quitosana e colágeno com células estromais mesenquimais humanas.

DELINEAMENTO

O projeto consiste em uma pesquisa experimental na qual serão extraídos diferentes tipos celulares humanos (queratinócitos, melanócitos, células estromais mesenquimais e células endoteliais) de material de descarte hospitalar como lipoaspirado, pele, limbo esclero-corneal, membrana amniótica e cordão umbilical para o desenvolvimento de novas terapias celulares para medicina regenerativa, como a aplicação de células estromais mesenquimais em sítios lesionados. As células extraídas também serão utilizadas para a verificação da biocompatibilidade de materiais propostos para uso clínico, tais como filmes de quitosana e colágeno, stents cardíacos de ferro e geopolímeros.

Os experimentos conduzidos servirão para avaliar parâmetros *in vitro* de biologia celular a fim de garantir a segurança dos materiais e terapias em estudo, entre eles estão: determinação da atividade da LDH, método de exclusão com azul de Tripán, análise da viabilidade celular (MTT), análise de genotoxicidade (ensaio cometa alcalino), coloração dos filamentos de actina, análise da morfometria nuclear e da densidade e análise por microscopia eletrônica.

O estudo será realizado no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre em colaboração com o Banco de Tecidos - Pele, Banco de Córneas e Serviço de Cirurgia Plástica da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O estudo visa desenvolver e aprimorar procedimentos de extração e processamento de material de descarte humano hospitalar devido a necessidade de gerar terapias mais acessíveis e eficazes para o reparo tecidual. Urge então o desenvolvimento de pesquisas que visem alternativas terapêuticas nacionais e que possam ser implantadas nos sistemas já funcionantes em saúde através da utilização de ricos materiais biológicos atualmente descartados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Isolamento, caracterização e cultivo das células estromais mesenquimais (MSCs) do tecido adiposo

O tecido adiposo será obtido do material de descarte de pacientes entre 18 e 40 anos, sem doenças graves ou histórico de câncer, submetidos a abdominoplastia ou lipoaspiração após prévia assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A extração de células mesenquimais oriundas do tecido adiposo (ADSCs) será realizada conforme o protocolo já estabelecido no laboratório de biologia celular (RODRIGUES et al., 2014). A técnica consiste, resumidamente, na digestão enzimática das células com collagenase tipo I, neutralização da enzima com Dulbecco's modified Eagle's Medium standard (DMEM) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino), centrifugação e ressuspensão do pellet formado com solução de lise de eritrócitos. Para os experimentos serão utilizadas as células entre as passagens 3 e 8.

As MSCs extraídas do tecido adiposo serão caracterizadas por imunofenotipagem no citômetro de fluxo FACSCalibur e deverão expressar marcadores típicos de células mesenquimais, tais como: CD44 e CD105 e expressar de modo deficiente, marcadores de linhagem hematopoiética e endotelial: CD45, CD14 e CD34. A capacidade das células em se diferenciar em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica será verificada após cultivo com StemPro Differentiation Kit (Gibco - Thermo

Fisher, USA e coloração com Oil Red O, Alcian blue e Alizarin Red (DOMINICI et al., 2006).

5.2 Processamento da Membrana Amniótica

As membranas amnióticas utilizadas serão processadas conforme protocolo interno não publicado, portanto em sigilo, do Banco de Pele da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. As pacientes que doarão a membrana amniótica após aplicação do TCLE terão entre 18 e 40 anos e devem ter realizado parto controlado por cesárea eletiva sem histórico de complicações obstétricas, também tendo realizado acompanhamento pré-natal e obtido resultados não-reagentes para os testes sorológicos para HIV, Hepatites B e C, Sífilis, doença de Chagas, Toxoplasmose (anticorpos IgM) e citomegalovírus (anticorpos IgM), não havendo presença de sintomas no neonato, febre materna superior a 38° C, gestação inferior a 34 semanas, ruptura da bolsa por mais de 12 horas antes do parto e duração do parto superior a 24 horas.

As membranas amnióticas processadas serão posteriormente utilizadas em modelo murino de lesão por queimadura conforme aprovado pelo parecer da CEUA (Anexo I) da UFCSPA nº 539/17 de 13/12/2017.

5.3 Extração, caracterização e cultivo de células endoteliais e mesenquimais do cordão umbilical

Amostras de cordão umbilical serão obtidos de partos a termo com o consentimento das mães através da assinatura do TCLE. As doadoras deverão ter entre 18 e 40 anos, parto sem complicações e ausência de doenças graves e/ou histórico de câncer, tendo realizado acompanhamento pré-natal e obtido resultados não-reagentes para os testes sorológicos para HIV, Hepatites B e C, Sífilis, doença de Chagas Toxoplasmose (anticorpos IgM) e citomegalovírus (anticorpos IgM), não havendo presença de sintomas no neonato, febre materna superior a 38° C, gestação inferior a 34

semanas, ruptura da bolsa por mais de 12 horas antes do parto e duração do parto superior a 24 horas.

A extração das HUVECs será realizada conforme a literatura e consiste, resumidamente, na coleta das amostras do cordão em PBS suplementado com 5% de Penicilina/Estreptomicina. A veia umbilical será lavada com PBS, as células serão soltas com Tripsina 10X e a suspensão centrifugada. As HUVECs serão cultivadas em meio EGM-2- Bullet Kit contendo fator de crescimento epidermal, hidrocortisona, fator de crescimento de fibroblasto humano, fator de crescimento endotelial, ácido ascórbico, antibióticos, fator de crescimento semelhante a insulina humana, heparina e 2% de SFB. As células serão usadas até a quinta passagem (LOY et al., 2017).

As células endoteliais extraídas serão caracterizadas por imunofluorescência usando os anticorpos contra CD31 e fator de von Willebrand, marcadores os quais deverão ser positivos para confirmar a identidade celular (BAUDIN et al., 2007).

Após retirar as veias e artéria, as células mesenquimais serão isoladas por migração a partir dos fragmentos do cordão e estas serão mantidas em condições de cultura celular com meio DMEM suplementado com SFB e antibióticos. A caracterização será realizada da mesma forma que as outras células mesenquimais acima citadas.

5.4 Isolamento e cultura de queratinócitos, melanócitos e células mesenquimais humanas oriundas de pele de descarte e limbo esclero-corneal

As amostras de pele e de limbo esclero-corneal humano serão doadas pelo Banco de Tecidos - Pele e pelo Banco de Córneas da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, respectivamente. A pele de descarte será obtida de pacientes entre 18 e 40 anos, sem doenças graves ou histórico de câncer, submetidos a abdominoplastia. O limbo esclero-corneal humano é o tecido descartado após o transplante de córnea, advindo de cadáver doador.

As células epiteliais de pele e limbo esclero-corneal serão isoladas pela padronização do método usado por Li, et al., 1998 e Gipson & Grill, 1982. Brevemente, amostras de pele e de limbo serão lavadas com álcool isopropílico, e vai ser lavada

serialmente com PBS a 2% de antibiótico. A amostra irá ser cortada em pedaços de cerca de 4 mm² e camadas epiteliais são obtidas incubando fragmentos de amostras durante 12 horas com 2 mg/ml dispase II com 1% de antibiótico a 4°C. As células da camada basal serão isoladas por tripsinização com 0.25% tripsina e 0.02% EDTA durante 15 minutos a 37 °C. As células isoladas serão semeadas em placas de cultura. A suspensão de células irá ser transferida para um tubo esterilizado e será centrifugada durante 5 minutos a 400 g, fazendo quatro lavagens com PBS. A suspensão de células será semeada em placas de cultura de 35 mm (SPL Lifesciences). O meio de cultura base será KSFM/HF12 (1:1) (Gibco®), suplementado com 0.40 mg/ml de EGF (Gibco®), 9.9 mg/ml de Extrato de pituitaria (Gibco®), 5 mg/ml de Insulina, Humulin R®, 0.5% DMSO (Riedel-de-Haën®), 1% de Antibiótico-antimicótico, aminoácidos não essenciais (Gibco®) e 1% Glutamax (Gibco®).

Para o isolamento de melanócitos, a suspensão celular será mantida em meio 254 bCF (SKU# M-500-254CF; Cascade Biologics, USA) com suplemento de crescimento (HMGS – SKU# S-002-5; Cascade Biologics, USA).

A caracterização fenotípica de culturas será feita pela imunofluorescência indireta. Para este será usado os anticorpos policlonais: anti-Dnp63a, anti-citoqueratina 19, e anti-PAX3. O anticorpo IgG conjugado com Isocianato de fluoresceína (FITC) serão usados como o anticorpo secundário. Os anticorpos serão diluídos com soro normal. Os controles negativos correspondem a culturas tratadas sem o anticorpo primário. Será usado meio de montagem com DAPI. As amostras serão observadas num microscópio de fluorescência.

As células mesenquimais oriundas da pele e limbo esclero-corneal serão extraídas por migração a partir dos fragmentos de tecido restantes após a remoção do epitélio. As placas da cultura serão colocadas em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% e temperatura constante de 37 °C. O meio de cultura será trocado a cada 48 horas, até a semiconfluência das células.

5.5 Determinação da atividade da LDH

A lise celular será analisada através da quantificação da lactato desidrogenase (LDH) (Labtest), que é uma proteína citosólica liberada no rompimento celular.

A atividade da LDH será medida para comprovação da integridade celular, uma vez que as enzimas degradadoras de nucleotídeos extracelulares estão com seu sítio catalítico voltado para o lado extracelular. Será seguido o protocolo do fornecedor deste kit.

5.6 Método de exclusão com azul de Tripán

O teste de exclusão com azul de Tripán é usado para determinar o número de células viáveis e mortas presente em uma suspensão celular. Após o cultivo direto e indireto com o biomaterial por 24 e 72 h, as células, serão tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em um volume conhecido. A suspensão celular e o azul de Tripán 0,25% serão misturados e transferidos para uma câmara de Neubauer. A quantidade de células viáveis será verificada utilizando um microscópio invertido de contraste de fase Olympus IX5 (LOY et al., 2017). O procedimento será realizado em triplicata com pelo menos três repetições.

5.7 Análise da viabilidade celular (MTT)

O ensaio de MTT será utilizado para determinar a permanência da viabilidade celular nas células submetidas ao contato direto e indireto com o biomaterial. O ensaio será conduzido conforme a técnica já descrita na literatura. O controle receberá o meio padrão para o cultivo de células.

Após 24 e 72 h de contato do material com as células, procede-se a incubação com o MTT por 3 h a 37°C. Nesse período, o sal da reação é reduzido na mitocôndria das células vivas através da clivagem da enzima succinato desidrogenase em cristais de formazan. Logo, a redução do MTT à formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. A solução de MTT será removida e adicionado dimetil sulfóxido (DMSO) e a densidade óptica obtida pelo leitor de multidetecção SpectraMax M2

(Molecular Devices Corporation, USA) a 560 nm. Os resultados serão expressos em porcentagem e calculados estatisticamente em comparação ao controle. O procedimento será realizado em triplicata com pelo menos 5 repetições (COSTA, 2013).

5.8 Análise de genotoxicidade (ensaio cometa alcalino)

O ensaio cometa alcalino é uma técnica para analisar danos causados ao DNA das células. A determinação se dá pela mensuração da migração do DNA cromossômico a partir do núcleo em caso de quebras. A técnica será realizada conforme a literatura, com algumas adaptações (SPEIT; HARTMANN, [s.d.]).

As células após o cultivo indireto e direto com o biomaterial por 24 e 72 h, serão lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em agarose com baixo ponto de fusão e imediatamente gotejadas sobre uma lâmina de vidro contendo uma camada de agarose com ponto de fusão normal. As lâminas serão incubadas com solução de lise celular para liberação dos núcleos e serão colocadas em uma cuba de eletroforese contendo tampão alcalino para permitir o desenrolamento do DNA. As lâminas serão neutralizadas, coradas com nitrato de prata e analisadas utilizando o microscópio invertido de contraste de fase Olympus IX5. A toxicidade genética causada pelo ferro nas células será tabulada de acordo com o índice de dano verificado pela migração da fragmentação do núcleo (RODRIGUES et al., 2014). O procedimento será realizado em triplicata com pelo menos três repetições.

5.9 Coloração dos filamentos de actina

A organização do citoesqueleto de actina das células submetidas ao contato com o biomaterial será realizada após fixação, lavagem e permeabilização das células, através de FITC-Phalloidin (Sigma) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Molecular Probes) para identificação de núcleos (40 minutos, 4°C, sala escura). As imagens serão obtidas com microscópio de fluorescência (Olympus IX51/ Olympus U-RFL-T) em diferentes filtros.

5.10 Análise da morfometria nuclear e da densidade

Para avaliar morfometricamente os núcleos das células em contato com o biomaterial será utilizado DAPI em microscopia de fluorescência (Olympus BX-50) . A quantificação dos núcleos se dará pelo software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Os dados serão apresentados graficamente por área versus índice de irregularidade nuclear. A densidade por mm² será determinada pelo número de núcleos por área usando ImageJ k 1.45 software.

5.11 Análise por microscopia eletrônica

Aspectos morfológicos das células em contato com o biomaterial serão observados por microscopia eletrônica de varredura (Carl Zeiss EVO). As células serão fixadas, incubadas com tetróxido de ósmio e desidratadas com álcool etílico para então serem montadas em alumínio e revestidas de ouro, procedendo-se a microscopia.

6 ORÇAMENTO

Orçamento aproximado para material de consumo:

Tipo	Item	Especificação do Item	Qtd	Valor Unit.	Valor Total
Cust eio	Material de Consumo	Anestésicos de uso veterinário	1 0	R\$ 200,00	R\$ 2.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Antibióticos e antifúngicos	1 0	R\$ 150,00	R\$ 1.500,00
Cust eio	Material de Consumo	Conjunto de material cirúrgico	1	R\$ 1.000,00	R\$ 1.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Kit de biologia molecular	1	R\$ 8.000,00	R\$ 8.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Kit para avaliação de morte celular	2	R\$ 2.000,00	R\$ 4.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Kit para dosagem de painel de citocinas inflamatórias	1	R\$ 15.000,00	R\$ 15.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Meio de cultura DMEM	2 0	R\$ 200,00	R\$ 4.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Membranas 0,22uM, 25mm	5	R\$ 150,00	R\$ 750,00

Cust eio	Material de Consumo	Painel de anticorpos para análise de cicatrização de pele	2	R\$ 2.500,00	R\$ 5.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Painel de anticorpos para caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais	1	R\$ 12.000,00	R\$ 12.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Plásticos para cultivo celular (englobando placas, garrafas, ponteiras, criotubos, tubos falcon, pipetas pasteur)	1	R\$ 10.000,00	R\$ 10.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Soro fetal bovino	1 5	R\$ 600,00	R\$ 9.000,00
Cust eio	Material de Consumo	Suportes para filtragem de meios	5	R\$ 500,00	R\$ 2.500,00
Totais		R\$ 74.750,00			

A fonte de financiamento será advinda do projeto aprovado pelo PPSUS: Decit/SCT IE/MS, CNPq, SES/RS e FAPERGS.

ORÇAMENTO ESTIMADO PARA SERVIÇOS DE TERCEIROS

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS PERMANENTES

O Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA possui os equipamentos científicos e vidrarias necessárias para o desenvolvimento do projeto, como: incubadora com atmosfera controlada, capela de fluxo laminar, geladeira, freezer, sistema de destilação e deionização de água, etc.

7 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Objetivo / metas	1º biênio	2º biênio	3º biênio	4º biênio	5º biênio
Revisão Bibliográfica	x	x	x	x	x
Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo, pele e cordão umbilical	x	x	x	x	
Isolamento dos queratinócitos e melanócitos da pele		x	x	x	x
Isolamento dos queratinócitos e melanócitos do limbo esclero-corneal	x	x	x	x	
Isolamento das HUVECs	x	x	x	x	x
Manutenção dos cultivos celulares	x	x	x	x	x
Caracterização fenotípica das culturas	x	x	x		
Realização dos ensaios de viabilidade		x	x	x	
Ensaio de genotoxicidade		x	x		
Análises morfológicas das células	x	x	x	x	x

Microscopia eletrônica			x	x	x
Análise dos dados	<u>x</u>	<u>x</u>	x	x	x
Elaboração de artigo científico		x	x	x	x

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banas, RA, Trumpower, C, Bentejewski, C, Marshall, V, Sing, G and Zeevi, A (2008). "Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells." *Hum Immunol* 69(6): 321-328.
- BERGMANN, C.; STUMPF, A. *Dental Ceramics*. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- BHAT, S. V. *Biomaterials*. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002.
- Bigbie, RB, Schumacher, J and Moll, D (1990). "Equine amnion as a biological dressing in the treatment of open wounds in horses." *Proceedings of the Annual Convention American Association of Equine Pract* 35: 117-125.
- BREITBACH, M. et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*, v. 110, n. 4, p. 1362–9, 15 ago. 2007.
- Chuong C., Nickloff B., Elias P., Goldsmith L., Macher E., Maderson A., Sundberg J., Tagami H., Plonka P., Thestrup-Pedersen K., Bernard B., Schroder J., Dotto P., Huang Y., Ren L., Qin Y. Observation of cicatricial fibroblasts in culture and its biological properties. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 12(6):332-5, 1998.
- Daniels J. Dart J., Tuft S., Khaw P. Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen*. 9 (6): 483-94, 2001.
- Davanger M., Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*. 229: 560-561, 1971.
- DelMonte D., Kim, T. Anatomy and physiology of the cornea. *Cataract. Refract. Surg. J.* (37):588-598, 2011.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.
- Du Y. Funderburgh M., Mann M., SundarRaj N., Funderburgh J. Multipotent Stem Cells in Human Corneal Stroma. *Stem Cells*. 23(9): 1266-1275, 2005.
- Fernández A., Moreno J., Prósper F., García M., Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas. *An Sist Sanit Navar*. 31(1): 53-69, 2008.
- Fitzpatrick T., Szabo G. The melanocyte: cytology and cytochemistry. *J Invest Dermatol*, 32:197–209, 1959.
- Fitzpatrick T., Breathnach A. The epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr*, 147:481-489, 1963.
- Frenk E., Schellhorn J. The Melanin Pigmentary Disorder in a Family with Hermansky-Pudlak Syndrome. *Dermatologica*, 139: 271-277, 1969.
- Gipson I., Grill SM. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 23: 269-273, 1982.
- Goldberg M., Bron A., Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 80:155- 171, 1982.
- Hanna C., Bicknell D., O'Brien J. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophtalmol*, 65: 695, 1961.
- HERMAWAN, H. et al. Iron–manganese: new class of metallic degradable biomaterials prepared by powder metallurgy. *Powder Metallurgy*, v. 51, n. 1, p. 38–45, 19 mar. 2008.

Higa K, Shimmura S, Miyashida H, Shimazaki J, Tsubota K. Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Exp Eye Res.*, 81:218-223, 2005.

Huang, A., Tseng, S. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32: 96-105, 1991.

Katz M. The human eye as an optical system. In Tasman W, Jaeger EA, editors: *Duane's Clinical Ophthalmology*, Vol 1, 1989.

KHADEMHOSEINI, A.; VACANTI, J. P.; LANGER, R. Progress in tissue engineering. *Scientific American*, v. 300, n. 5, p. 64–71, maio 2009.

Kim, JC and Tseng, SC (1995). "Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas." *Cornea* 14(5): 473-484.

Kolozsvari L., Nogradi A., Hopp B., Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43:2165- 8. 2002.

Lanza, R., Langer R., Chick W. *Principles of tissue engineering*. Academic Press; R.G. Landes. 808, 1997.

Lavker R., Dong G., Cheng S., Kudoh K., Kotsarelis G., Sun T. Relative proliferative rates of limbal and cornea epithelia: implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 32: 1864, 1991.

LOY, C. et al. A planar model of the vessel wall from cellularized-collagen scaffolds: focus on cell– matrix interactions in mono-, bi- and tri-culture models. *Biomaterials Science*, v. 5, n. 1, p. 153–162, 2017.

MAO, Angelo S.; MOONEY, David J. Regenerative medicine: current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 47, p. 14452-14459, 2015.

Menon G. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev*, 54 (1):S3-S17, 2002.

MORAVEJ, M.; MANTOVANI, D. Biodegradable metals for cardiovascular stent application: Interests and new opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 7, p. 4250–4270, 2011.

Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, Hisatomi T, Qiao H, Yamada J, Fukata M, Ishibashi T, Harada M, Kinoshita S. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 46:497-503, 2005.

Osei-Bempong C., Henein C., Ahmad S. Culture conditions for primary human limbal epithelial cells. *Regen Med.* 4(3): 461-470, 2009.

Pfister R. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol*, 12: 654, 1973.

Rejzek, A, Weyer, F, Eichberger, R and Gebhart, W (2001). "Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies." *Cell Tissue Bank* 2(2): 95-102.

Robins, A. *Biological Perspectives on Human Pigmentation*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1-253, 1991.

RODRIGUES, C; DE ASSIS, AM; MOURA, DJ; HALMENSCHLAGER, G.; SAFFI, J.; XAVIER, LL e WINK, MR. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a Pre-clinical Rat model. *PloS one*, v.9, n.5, 2014.

SYKARAS, N. et al. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, v. 15, n. 5, p. 675–90, 2000.

Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol.*, 103:49-62, 1986.

Shimazaki, J, Shinozaki, N and Tsubota, K (1998). "Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon." *Br J Ophthalmol* 82(3): 235-240.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in molecular biology*, v. 314, p.275-286, 2006.

Suter M., Cramer F., Olivry T., Mueller E., Tschärner C., Jensen P. Keratinocyte biology and pathology. *Vet Dermatol*, 8(2):67-100, 1997.

Talmi, YP, Sigler, L, Inge, E, Finkelstein, Y and Zohar, Y (1991). "Antibacterial properties of human amniotic membranes." *Placenta* 12(3): 285-288.

Walsh, S and Midha, R (2009). "Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair." *Neurosurg Focus* 26(2): E2.

Wolbank, S, Peterbauer, A, Fahrner, M, Hennerbichler, S, van Griensven, M, Stadler, G, Redl, H and Gabriel, C (2007). "Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue." *Tissue Eng* 13(6): 1173-1183.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res*, 52: 44-56, 2001.

ANEXO I



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Rua Sarmento Leite, 245 - Fones: 0 xx 51 3303 9000 - Fax: 0 xx 51 3303.8810
CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 206/17 Parecer 539/17

2) DATA DO PARECER: 13/12/17

3) TÍTULO DO PROJETO:

Desenvolvimento de modelo pré-clínico para avaliação da membrana amniótica humana para tratamento de queimaduras de diferentes graus.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Wink

5) RESUMO DO PROJETO:

O tratamento padrão para em casos de queimadura de pele de grandes áreas é de enxerto de pele autóloga. Propõem-se a utilização de membrana amniótica de doadoras de placenta como curativo para as queimaduras de pele. Esse tratamento será comparado com a utilização de células tronco mesenquimais obtidas de cultura de células a partir de tecido adiposo retirado de cirurgia de lipossucção. No estudo será feita uma comparação entre o curativo comercial, a utilização de membrana amniótica sozinha, membrana amniótica + células tronco mesenquimais e membrana amniótica aderida com fibroblastos de ratos.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Caracterizar a membrana amniótica humana como curativo biológico regenerador de lesões cutâneas superficiais e profundas, na ausência ou presença de células tronco mesenquimais.

- 1- Padronizar protocolos de decelularização, criopreservação e preservação em glicerol da MA.
- 2- Padronizar protocolos para isolamento, cultivo e caracterização de MSCs derivadas de tecido adiposo humano. (MSCs).
- 3- Caracterizar a MA decelularizada como scaffold para MSCs avaliando-se adesão, viabilidade, citotoxicidade, migração e morfologia celular.

4- Avaliar o efeito da MA na presença ou ausência de MSCs na regeneração tecidual em modelo murino de lesão cutânea, por queimadura de diferentes graus, através de análises histológicas e de marcadores de inflamação.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐

Ensino

☒

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒

Adequado

☐

Comentários

Introdução

☒

Adequada

☐

Comentários

Objetivos

☒

Adequados

☐

Comentários

Relevância e Justificativa

☒

Adequados

☐

Comentários

Materiais e Métodos

☒

Adequados

☐

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

☒

Adequado

☐

Comentários

Orçamento e fonte financiadora

☒

Adequados

☐

Comentários

Referências Bibliográficas

☒

Adequadas

☐

Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒

Sim

☐

Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B |

C

☐

D

☐

E

☐

Justifique:

Grau de invasividade = 3

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: ☐ Sim

☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: ☐ Sim

☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: ☐ Sim

☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual?

UFCSPA – Laboratório de Biologia Celular

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data

Espécie

Sexo

Quantidade

12) RECOMENDAÇÃO:

☒

Aprovado

☐

Com Pendência

☐

Não aprovado

Data de início 01/09/2017 Data de Término 31/12/2021

Comentários gerais sobre o projeto:

1- As questões foram adequadamente respondidas.

2- A CEUA considerou os animais em 190.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROJETO DE PESQUISA

A) TÍTULO

Avaliação dos efeitos da suplementação com ômega-3 ou zinco na sarcopenia da obesidade

B) EQUIPE

Coordenadora: Marilene Porawski, PPG Biociências e PPG Medicina:
Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre –
UFCSPA

Colaboradores:

Renata Padilha Guedes, PPG Biociências e PPG Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Márcia Giovenardi, PPG Biociências e PPG Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Sabrina Alves Fernandes, Pós-doc PPG Hepatologia UFCSPA

Orlando Vieira Furtado Filho, Pós-doc PPG Biociências UFCSPA

Milene Cabreira, aluna de mestrado PPG Biociências UFCSPA

C) CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

RESUMO

A obesidade e a inflamação crônica associada a ela tem um efeito negativo na saúde. O excesso de tecido adiposo leva a um aumento da produção de adipocinas (como IL-6, TNF α , proteína quimiotática de monócitos-1 e inibidor do ativador do plasminogênio-1) com efeitos pró-inflamatórios, pró-fibrogênicos, pró-angiogênicos e pró-oxidantes em vários tecidos. Evidências recentes demonstram que as complicações metabólicas também aumentam o risco para as doenças musculo-esqueléticas como sarcopenia da obesidade (perda muscular na obesidade), osteoporose, tendinopatia e osteoartrite, condições que contribuem significativamente para incapacidade e tempo de afastamento do trabalho. Resultados experimentais suportam a ideia de que o músculo

pode estar entre os primeiros tecidos do sistema músculo-esquelético afetados pela dieta obesogênica, e a inflamação, característica dessa condição, provavelmente desempenha um papel substancial nesta perda de integridade. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 e/ou zinco sobre a sarcopenia da obesidade. Será utilizado um modelo experimental de obesidade induzida por dieta em ratos Wistar. Após 8 semanas da dieta obesogênica os animais receberão suplementação de ômega-3 (500mg/Kg), ou zinco (10mg/Kg) administrados por gavagem durante 4 semanas, totalizando 12 semanas de experimento. Os animais serão anestesiados e será realizada a coleta de sangue e tecidos (fígado, tecido adiposo e músculo gastrocnêmio e soleo) para as análises bioquímicas (glicemia, triglicerídeos, colesterol, insulina, leptina, interleucina 1 β , interleucina 6, TNF α e Cox2) e moleculares (mTor, Toll like 4, miostatina, PPAR, AKT, NFkB, iNOS). Espera-se que a suplementação com ômega-3 ou zinco diminua a resistência à insulina e reduza a inflamação sistêmica e o acúmulo de gordura no fígado e no tecido muscular diminuindo a sarcopenia da obesidade e melhorando a função muscular e consequentemente a qualidade de vida dos obesos.

PALAVRAS-CHAVE: obesidade, sarcopenia, ômega-3, zinco

INTRODUÇÃO

Obesidade e síndrome metabólica são condições encontradas com frequência cada vez maior na população e estão relacionadas com a resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão e também são responsáveis pelo desenvolvimento de doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). A DHGNA representa a manifestação hepática da síndrome metabólica e vai do simples acúmulo de triglicerídeos à inflamação hepática podendo evoluir para cirrose (Schiavo et al., 2018; Kleiner et al., 2005).

A obesidade e a inflamação crônica associada a ela tem um efeito negativo na saúde. O excesso de tecido adiposo leva a um aumento da produção de adipocinas (como IL-6, TNF α , proteína quimiotática de monócitos-1 e inibidor do ativador do plasminogênio-1) com efeitos pró-inflamatórios, pró-fibrogênicos, pró-angiogênicos e pró-oxidantes em vários tecidos (Schiavo et al., 2018).

Evidências recentes demonstram que as complicações metabólicas também aumentam o risco para as doenças musculoesqueléticas como sarcopenia da obesidade (perda muscular na obesidade), osteoporose, tendinopatia e osteoartrite, condições que

contribuem significativamente para incapacidade e tempo de afastamento do trabalho (Collins et al., 2018).

O músculo é altamente plástico, sofre remodelamento regular e é responsável por grande parte da utilização de glicose no corpo, que quando prejudicada leva à resistência à insulina. Além disso, a integridade muscular prejudicada, definida como perda muscular persistente, acúmulo de lipídios intramusculares ou deposição de tecido conjuntivo, é um marco da disfunção metabólica. Muitas vias inflamatórias comuns têm sido implicadas na patogênese dos tecidos inter-relacionados do sistema músculo-esquelético (por exemplo, tendinopatia, osteoporose e osteoartrite). Resultados experimentais suportam a ideia de que o músculo pode estar entre os primeiros tecidos do sistema músculo-esquelético afetados pela dieta obesogênica, e a inflamação, característica dessa condição, provavelmente desempenha um papel central nesta perda de integridade. Outra característica importante da obesidade é o acúmulo de gordura ectópica em tecidos não adiposos e o conteúdo lipídico miocelular leva ao aumento da carga lipídica e resistência à insulina. A perda muscular em consequência do acúmulo de lipídios e do aumento das adipocinas inflamatórias ativa o remodelamento muscular inadequado levando ao acúmulo de tecido fibroso a consequente perda da função muscular (Collins et al., 2016).

A coexistência de sarcopenia e obesidade no mesmo paciente, condição definida como sarcopenia da obesidade, confere um risco de deficiência e incapacidade física que é significativamente maior que o risco induzido por cada uma das duas condições sozinhas (Beavers et al., 2013).

A sarcopenia é uma síndrome caracterizada por perda generalizada de massa muscular esquelética e consequente diminuição da força muscular com um aumento no risco de incapacidade física, redução na qualidade de vida e morte. O impacto clínico negativo da redução na massa muscular esquelética e perda de função muscular foi originalmente descrita em idosos, mas seu papel é considerado relevante também em muitas doenças crônicas progressivas, como doença renal, insuficiência cardíaca, insuficiência pulmonar e diabetes tipo 2 (Cruz-Jentoft et al., 2010).

REVISÃO DA LITERATURA

Obesidade

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal que acarreta danos à saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a causa fundamental

é o desequilíbrio entre ingestão e gasto de calorias (WHO, 2016). Em uma perspectiva mais ampla, envolve fatores sociais, comportamentais, ambientais, culturais, psicológicos, metabólicos e genéticos que predisõem a este desequilíbrio (Global Nutrition Report 2017).

O excesso de massa corporal pode ser estimado por diferentes métodos ou técnicas, como medida de pregas cutâneas, medida da relação cintura-quadril, ultrassom, ressonância magnética, entre outras. Entretanto, devido à simplicidade de obtenção, baixo custo e correlação com a gordura corporal, o Índice de Massa Corporal (IMC) tem sido utilizado e aceito para estudos epidemiológicos em adultos. O IMC é obtido a partir da divisão do peso, em quilogramas, pela altura em metros ao quadrado (kg/m^2). A tabela 1 apresenta a classificação do IMC proposta pela OMS que é baseada em padrões internacionais para pessoas adultas descendentes de europeus (WHO, 2016; Gupta et al., 2015).

Tabela 1. Classificação do índice de massa corporal (IMC)

Classificação	IMC (kg/m^2)
Baixo peso	$< 18,49$
Peso normal	18,5 a 24,99
Sobrepeso	≥ 25
Pré-obeso	25 a 29,99
Obeso I	30 a 34,99
Obeso II	35 a 39,99
Obeso III	≥ 40

Adaptado de WHO (2000)

Como resultado da modificação dos padrões alimentares e atividade física, o mundo tem sido acometido pela epidemia da obesidade. À medida que países de média e baixa renda se tornam mais prósperos e entram no comércio e na cultura cada vez mais globalizados, eles adquirem benefícios, mas também os problemas dos países de maior renda. Alimentos industrializados ricos em açúcar e gordura vêm tomando espaço da alimentação tradicional. Como consequência, a obesidade assume taxas nunca antes observadas e continuamente crescentes (Gupta et al., 2015).

A transição nutricional, caracterizada pelo estado nutricional e pelos padrões dietéticos como o aumento do consumo de alimentos ricos em gordura e açúcares se associam às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e estão mudando o panorama

de problemas de carência para os de excesso de nutrientes. Sabe-se que um aumento do IMC está relacionado ao aumento dos DCNT e que o tratamento específico da obesidade também pode atuar no controle de outras DCNT. As DCNT foram responsáveis por 38 milhões de mortes em todo o mundo em 2012. A obesidade tornou-se uma prioridade de saúde pública, dada a sua crescente prevalência e suas vastas consequências à saúde (Global Nutrition Report 2017; DiBonaventura et al., 2018).

A obesidade mundial quase triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos de idade tinham excesso de peso. Destes mais de 650 milhões eram obesos, 39% dos adultos com idade igual ou superior a 18 anos apresentavam sobrepeso e 13% eram obesos. Neste mesmo ano, 41 milhões de crianças menores de 5 anos e mais de 340 milhões DE crianças e adolescentes de 5 a 19 anos tinham sobrepeso ou obesidade (WHO 2016).

A Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) realizada em 2016 revelou um aumento na obesidade entre os brasileiros. Uma em cada cinco pessoas no país está acima do peso e a prevalência da doença passou de 11,8%, em 2006, para 18,9%, em 2016 (Brasil. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil. 2016). Portanto, a perda de peso é um objetivo primordial nas estratégias de saúde pública dirigidas a essa população.

O peso corporal excessivo predispõe o corpo a várias doenças, entre elas podemos citar: doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemias, aterosclerose entre outras. Estudos recentes já apontam os mecanismos pelos quais a obesidade e a ingestão energética aumentada exercem efeitos prejudiciais à saúde induzindo o estresse oxidativo (Elbahrawy et al., 2017).

A obesidade aumenta a necessidade metabólica tecidual, com o consequente aumento do consumo de oxigênio. Com isso, a produção de espécies reativas de oxigênio como os superóxidos e os peróxidos de hidrogênio aumentam devido à maior respiração mitocondrial. Se a produção dessas espécies de oxigênio exceder a capacidade antioxidante da célula, o estresse oxidativo pode ocorrer, resultando em peroxidação lipídica. Outro mecanismo através do qual a obesidade pode aumentar a peroxidação lipídica é através da lesão celular. A injúria celular, por sua vez, libera citocinas como o fator de necrose tumoral que gera espécies reativas de oxigênio. E por último é proposto que uma dieta hiperlipídica altere o metabolismo do oxigênio, pois as

moléculas dos ácidos graxos com duplas ligações são vulneráveis a reações oxidativas e consequentemente podem levar a peroxidação lipídica (Olusi, 2002).

Diversas medidas como intervenções farmacológicas e cirúrgicas, prática de atividades físicas para redução do peso, restrição calórica e mudanças comportamentais têm sido propostas para o tratamento da obesidade e consequente redução do estresse oxidativo. Terapia com antioxidantes, desde que em dose e tempo de tratamento adequado, também parece válida. Todas essas intervenções favorecem a perda de peso que se associa a uma redução na produção de espécies oxidantes e a uma melhor capacidade antioxidante, favorecendo uma redução dos fatores de risco e uma melhoria das comorbidades (Ibitoye, et al, 2017).

Diferentes nutrientes são estudados como antioxidantes em doenças crônicas como o ácido ascórbico, os flavonoides, o β -caroteno, o α -tocoferol, o zinco, o manganês, o cobre e o selênio. Catalán-Latorre e colaboradores (2018) verificaram em um estudo com células que a administração da curcumina em uma forma mais estável proporciona um ótimo efeito protetor contra o estresse oxidativo. Ibitoye e colaboradores (2017) investigaram o efeito antiobesidade do extrato aquoso de folhas de *Dioscoreophyllum cumminsii* em ratos induzidos à obesidade por uma dieta hiperlipídica. O tratamento por quatro semanas com esta planta melhorou os parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos (Zimmermann & Kirsten, 2008; Ibitoye, et al., 2017; Catalán-Latorre et al., 2018).

Sarcopenia

A sarcopenia é uma síndrome caracterizada pela perda progressiva e generalizada de massa muscular esquelética acompanhada do declínio da força muscular. Essa condição predispõe ao aumento no risco de quedas e no desenvolvimento de incapacidades físicas diversas que diminuem a qualidade de vida e aumentam o risco de morte (Delmonico et al., 2007; Cruz-Jentoft et al., 2010).

A sarcopenia é uma das variáveis utilizadas para definição da síndrome de fragilidade e confere maior risco para quedas, fraturas, incapacidade, dependência, hospitalização recorrente e mortalidade (Rolland et al., 2008). A presença de sarcopenia colabora para a perda funcional, incluindo declínios na marcha e no equilíbrio, aumento dos riscos de queda e perda de independência. A falta de atividade física e um alto

índice de massa corpórea, torna o sarcopênico mais suscetível à morte (Murphy et al., 2014).

Em algumas condições clínicas a massa corporal magra é perdida enquanto massa gorda pode ser preservada ou até aumentado. Esse estado é chamado de sarcopenia da obesidade e, portanto, a relação entre a redução da massa e força muscular é frequentemente independente da massa corporal (Stenholm et al., 2008). A ingestão excessiva de calorias, a inatividade física, a inflamação de baixo grau, a resistência à insulina e as mudanças no ambiente hormonal colaboram para uma redução na qualidade do tecido muscular de indivíduos obesos. Atualmente considera-se que alterações na composição muscular como o "marmoreio" ou infiltração de gordura no músculo, diminui a qualidade e desempenho do trabalho muscular (Cruz-Jentoft et al., 2010).

A sarcopenia da obesidade, ou diminuição da quantidade e da qualidade da massa muscular com aumento da massa gorda, não é apenas associada a deficiências na função física (Zamboni et al., 2008), mas também resulta em ganho de peso e um aumento de 8 a 11 vezes no risco de três ou mais deficiências físicas adicionais (Baumgartner, 2000). A sarcopenia da obesidade foi definida pela primeira vez clinicamente usando dois critérios: (a) indivíduo que apresenta 2 desvios padrão no índice de massa muscular ($\text{massa muscular} / \text{altura}^2$) comparado ao indivíduo jovem, saudável do mesmo sexo; e (b) indivíduo que tenha um percentual de gordura corporal maior que o percentual médio de gordura corporal para cada sexo (sexo masculino: índice de massa muscular $<7,26 \text{ kg/m}^2$ com gordura corporal percentual $> 27\%$; feminino: índice de massa muscular $<5,45 \text{ kg/m}^2$ corpo percentual de gordura $> 38\%$) (Baumgartner, 2000, Collins et al., 2018).

Para o diagnóstico de sarcopenia o Consenso Europeu (EWGSOP) recomenda a avaliação da redução na massa muscular (critério 1) e perda de função que pode ser relacionada com redução da força muscular (critério 2) ou de desempenho físico (critério 3). Assim, o diagnóstico requer a identificação do critério 1 mais a identificação do critério 2 ou critério 3 (tabela 2).

Tabela 1. Critérios para diagnóstico da sarcopenia.

Diagnóstico baseado na identificação do critério 1 mais critério 2 ou critério 3
1. Redução da massa muscular

2. Redução da força muscular
3. Redução no desempenho físico

Ômega-3

Há décadas, o metabolismo do ácido graxo poli-insaturado (AGPI) ômega-3, têm sido alvo de muitos estudos. Hoje sabemos que o ômega-3 exerce uma grande variedade de efeitos biológicos, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento normais, além de desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento da doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes, resistência à insulina, depressão, artrite, diversas doenças inflamatórias e autoimunes e câncer (Simopoulos, 1999; Siriwardhana et al., 2012). Atualmente o ômega-3 é amplamente conhecido pelos pesquisadores e pela comunidade em geral, por seus efeitos benéficos na redução dos triglicerídeos, na proteção cardiovascular e por suas ações anti-inflamatórias (Mori et al., 1999; Flachs, et al., 2009; Calder, 2014).

Um dos principais mecanismos anti-inflamatórios exercido pelo ômega-3 é por meio da inibição competitiva exercida pelo seu metabólito ácido eicosapentaenoico (EPA) com o ácido araquidônico (AA) pela enzima ciclooxigenase (COX), que produz eicosanóides pró-inflamatórios. Quando EPA é submetido a oxidação pela COX, prostaglandinas da série 3, com baixa atividade inflamatória são geradas enquanto que o AA gera prostaglandina da série 2 altamente pró-inflamatória. Além disso, como EPA é estruturalmente semelhante ao AA, o EPA também pode competir com AA pela incorporação aos fosfolipídios das membranas celulares, garantindo fluidez à membrana (Gillies et al., 2012; Calder, 2017).

Outro importante mecanismo pelo qual o ômega-3 exerce seus efeitos anti-inflamatórios é por meio da redução da ativação do fator nuclear kappa B (NFκB). Este fator de transcrição é um potente indutor da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), ambos diminuídos por EPA e ácido docosaexaenoico (DHA) e seus mediadores lipídicos pró-resolução (Siriwardhana et al., 2012; Calder, 2014; Serhan, 2014).

Além dessas importantes ações anti-inflamatórias, o ômega-3 também demonstrou ser capaz de realizar imunomodulação. O ômega-3 e seus metabólitos ativos

são incorporados na membrana das células imunes, dessa forma afetando a fagocitose, a sinalização das células T e a capacidade de apresentação do antígeno (Calder, 2007).

Soma-se a isso, que o ômega-3 também possui atividade antioxidante. No estudo de Richard e colaboradores (2008) foi caracterizada a ação antioxidante do ômega-3. Neste estudo, a suplementação de células endoteliais aórticas humanas com ômega-3 resultou em menor formação de espécies ativas de oxigênio (ERO) em comparação com células suplementadas com ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados da série ômega-6 (Richard, et al., 2008).

O ômega-3 também chamou a atenção por sua capacidade de regular o peso e a composição corporal, prevenindo a obesidade e a síndrome metabólica a ela associada. O ômega-3 é capaz de melhorar a inflamação de baixo grau proveniente do tecido adiposo e induzir mudanças no padrão de secreção de adipocinas, resultando em uma melhora do metabolismo geral (Flachs et al., 2009; Kalupahana et al., 2010; Moreno-Aliaga et al., 2010).

Neste sentido, em um estudo com humanos com sobrepeso e hipertensão foi evidenciado que a ingestão de peixe (rico em ômega-3) aliado a uma dieta com restrição de energia e gordura tem benefícios significativos sobre o peso corporal, metabolismo da glicose, insulina e metabolismo lipídico, aumentando o colesterol HDL e diminuindo os triglicerídeos (Mori et al., 1999). O ômega-3 também mostrou modular a adipogênese (Kim et al., 2006), suprimir a lipogênese (Perez-Echarri et al., 2009) e induzir a beta-oxidação de ácidos graxos em órgãos chave para o metabolismo, como o intestino delgado, músculo esquelético, fígado e o tecido adiposo branco (TAB) (Flachs et al., 2009; van Schothorst, et al., 2009). Essas ações são mediadas pela ligação do ômega-3 com o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) que controla a sinalização celular inflamatória e os padrões de expressão gênica envolvidos no metabolismo oxidativo (Flachs et al., 2009; Gillies et al., 2012); pela modulação da atividade de AMPK, regulando assim a via de sinalização da insulina por meio da ligação do ômega-3 com o receptor acoplado a proteína G-120 (GPR120), o que promove ação anti-inflamatória e aumento da sensibilidade à insulina (Oh et al., 2010); e também pela inibição da ativação do inflamassoma NLRP3 (Yan et al., 2013).

Além disso, conforme revisado por Costantini e colaboradores, o ômega-3 exerce efeitos significativos sobre a composição da microbiota intestinal. Dessa forma, influenciando no retorno da homeostase intestinal em situações como ganho de peso e obesidade, resistência à insulina, aumento da permeabilidade intestinal, dieta rica em

gordura, doenças inflamatórias intestinais e depressão. Por todas essas ações, o ômega-3 pode ser considerado como um prebiótico, capaz de restaurar a eubiose intestinal em diversas condições patológicas (Costantini et al., 2017). EPA e DHA também atuam na preservação da integridade da barreira intestinal através da atenuação do aumento da permeabilidade do epitélio intestinal induzida por citocinas inflamatórias (Li et al., 2008).

Embora seja consenso que o consumo regular de peixes ricos em ácido graxo ômega-3 faça parte de uma dieta saudável, a recomendação de suplementar a dieta com cápsulas de óleo de peixe cerca-se por controvérsias, fomentadas por resultados conflitantes de estudos clínicos. A capacidade de reduzir os níveis de triglicerídeos depende da dose, com uma redução aproximada de 5% a 10% para cada 1 g de EPA/DHA consumido ao dia e é maior nos indivíduos com níveis basais mais elevados de triglicerídeos. Com base em estudos clínicos, a I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular recomenda a suplementação de 1 a 2 g de ômega 3 ao dia (Santos et al., 2013).

Zinco

O zinco é um metal essencial para plantas, animais e seres humanos. Este micronutriente difere dos outros metais de transição por conter a camada eletrônica “d” completa e, portanto, não participa de reações redox, mas age como ácido de Lewis para aceitar um par de elétrons, sendo desta forma, um íon estável. O zinco ocorre naturalmente como cinco isótopos estáveis ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn . Geralmente se complexa com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos e tem afinidade com grupos tióis e hidrogênio (Mafra & Cozzolino, 2004).

A maior parte do zinco é absorvida no jejuno e a captação deste mineral pela borda em escova é regulada homeostaticamente por mecanismos de difusão e processos mediados por carreadores. A capacidade de transporte dos carreadores aumenta quando há baixa ingestão de zinco e em situações de alto consumo ocorre um mecanismo de difusão passiva sem saturação (Mafra & Cozzolino, 2004). Deve-se levar em consideração que a simples presença do nutriente na dieta não garante sua utilização pelo organismo, pois existem fatores que podem comprometer a biodisponibilidade dos micronutrientes. O conteúdo de fitato, por exemplo, reduz a biodisponibilidade de zinco e o ferro, cálcio e cobre também podem ter efeito negativo sobre sua absorção. Já as

fibras, taninos e cafeína parecem não afetar a utilização do zinco pelo organismo (Lonnerdal, 2000).

Após ser absorvido, o zinco é liberado pela célula intestinal, passa para os capilares mesentéricos e é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e distribuído para os outros tecidos. Os genes envolvidos no transporte do zinco codificam proteínas na membrana celular e são responsáveis pelo efluxo deste mineral a tecidos como intestino, rins, fígado, testículos, cérebro e glândulas mamárias (Mafra & Cozzolino, 2004).

Estudos nas áreas de nutrição, fisiologia, medicina e bioquímica vêm aclarando o conhecimento das várias funções do zinco. Dentre muitos papéis fisiológicos, o zinco é componente funcional e/ou estrutural de mais de 300 enzimas, muitas delas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas; está envolvido na estabilização de membranas estruturais e na proteção celular, prevenindo a peroxidação lipídica; é indispensável para a atividade de enzimas participantes da síntese de DNA e RNA; influencia a divisão celular; participa do estímulo pós-receptor da insulina, o qual aumenta a translocação dos transportadores de glicose dos seus sítios intracelulares para a membrana plasmática. Também, o zinco ainda desempenha importante papel na regulação do apetite, estando envolvido na produção e/ou secreção de hormônios reguladores do metabolismo energético como a insulina e leptina (Sanna et al., 2018).

O conteúdo de zinco varia bastante de um alimento para outro, sendo encontrado na quantidade de 0,002 mg / 100 gramas de clara de ovo até 75 mg / 100 gramas de ostras. As principais fontes alimentares deste mineral são mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos e ovos. As nozes e leguminosas são fontes relativamente boas de zinco. O consumo deste micronutriente também sofre influência da fonte de proteína da dieta. Dietas a base de ovos, leite, frango e peixe têm menor razão zinco/proteína em comparação com dietas a base de mariscos, ostras e carnes vermelhas. O consumo preconizado atualmente para mulheres saudáveis é de 8 mg/dia, enquanto para homens é de 11 mg/dia (Olza et al., 2017).

A deficiência de zinco foi verificada pela primeira vez em humanos por Prasad et al, em 1961. Os sinais e sintomas incluíam baixa estatura, hipogonadismo e perda do apetite. De forma imediata, a deficiência de zinco acarreta mobilização das reservas funcionais e na deficiência grave e prolongada ocorre diminuição da concentração do mineral no plasma, células sanguíneas, cabelo e urina, assim como redução da atividade de enzimas como anidrase carbônica, fosfatase alcalina e carboxipeptidase. Na

deficiência grave também são comuns os sinais e sintomas de anorexia; sinais de retardo no crescimento e déficit no crescimento fetal; distúrbios na cicatrização; intolerância à glicose pela diminuição da produção de insulina; hipogonadismo; impotência sexual e atrofia testicular; atraso na maturação sexual e esquelética; restrição da utilização da vitamina A; fragilidade osmótica dos eritrócitos; diminuição da atividade da interleucina-2; disfunções imunológicas; hipogeusia, uma vez que o zinco é componente de uma proteína envolvida no paladar, a gustatina; desordens de comportamento, aprendizado e memória; função mental deprimida, encefalopatia; diarreia; dermatite e alopecia (Prasad et al., 1961; Pedraza & Sales, 2015).

Muitos fatores podem levar a deficiência de zinco, como consumo inadequado deste micronutriente, interação do zinco com outros nutrientes da dieta diminuindo sua biodisponibilidade, má absorção, doenças renais entre outros. Estudos demonstram que a deficiência de zinco é revertida com a suplementação deste micronutriente (Drake et al., 2017).

A obesidade pode ser acompanhada de uma série de distúrbios metabólicos. Dentre estes, a alteração do metabolismo de zinco é relatada. Indivíduos obesos apresentam maior IMC, diminuição da concentração sérica de zinco e menor atividade da SOD quando comparados aos indivíduos não obesos o que pode levar a uma resposta antioxidante reduzida e aumentar o risco para comorbidades. Em um modelo de obesidade induzido pela ingestão de sacarose (32%) foi demonstrado que os animais que receberam a dieta associada com baixos teores de zinco desenvolveram maior adiposidade que os animais que receberam a mesma dieta com uma concentração maior de zinco (Torkanlou et al., 2016)

JUSTIFICATIVA

As transformações alimentares ocorridas no mundo neste último século, apontam para um predomínio da dieta ocidentalizada, caracterizada pelo excesso de nutrientes e rica em gordura e carboidratos. Além disso houve uma diminuição progressiva da atividade física e aumento significativo do sedentarismo. A combinação desses dois fatores converge para o aumento no número de casos de obesidade em todo o mundo. Isso representa aumento na morbidade e na mortalidade associadas à obesidade, já que este é fator de risco para várias doenças como diabetes tipo II, hipertensão, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas, entre outras. Atualmente, estudos apontam que a perda muscular observada na obesidade pode não ser facilmente revertida, pois a

infiltração de gordura no tecido muscular aumenta a inflamação local que leva à lesão e remodelamento do músculo com aumento da fibrose e consequente perda da função muscular.

A sarcopenia da obesidade é uma condição pouco estudada devido à dificuldade de identificar essa condição no fenótipo obeso, porém a identificação deste quadro e o tratamento precoce são importantes para prevenir uma perda de função muscular grave que pode levar a incapacidades físicas permanentes e dificuldades para manter uma rotina de atividade física para o tratamento da obesidade e manutenção da integridade muscular.

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade, o tratamento dessa condição ainda é indefinido. Estratégias de perda de peso nem sempre são eficazes. O manejo da obesidade envolve mudanças nos hábitos alimentares, atividade física ou mesmo administração de alguns medicamentos e intervenção cirúrgica. No entanto, um tratamento coadjuvante ainda é necessário e a suplementação com ômega-3 ou zinco podem reduzir a inflamação e a resistência à insulina colaborando no controle das comorbidades associadas à obesidade.

D) OBJETIVOS E METAS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 ou zinco sobre a sarcopenia da obesidade.

Objetivos Específicos

- 1** Avaliar as alterações metabólicas do modelo e a ação dos diferentes tratamentos através da medida de glicemia, triglicerídeos, colesterol, leptina, insulina e de resistência insulínica pelo índice HOMA.
- 2** Analisar as características histológicas do modelo e a ação dos diferentes tratamentos através da coloração de hematoxilina e eosina e picrosírius em fígado e músculo esquelético.
- 3** Avaliar parâmetros inflamatórias através da medida da IL-1 β , IL-6, TNF α , Cox2 no plasma dos animais obesos e tratados.
- 4** Analisar por imunohistoquímica a presença de IL-1 β , IL-6, TNF α e misotatina, no músculo esquelético dos animais obesos e tratados.

- 5 Medir a expressão proteica de NFkB, iNOS, PPAR γ , mTOR, TLR4, p-AKT e miostatina no fígado e no músculo esquelético dos animais obesos e tratados.

E) METODOLOGIAS E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

1. Animais

Serão utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar, com 4 semanas de vida provenientes do biotério da UFCSPA. Os animais serão mantidos no biotério da UFCSPA, em caixas plásticas com 2 animais por caixa, com temperatura média de 22°C, ciclo de 12 horas claro/escuro.

Os animais que recebem a dieta controle serão alimentados somente com a ração padrão, enquanto os animais que serão induzidos à obesidade receberão ração hipercalórica (PRAGSOLUÇÕES) durante 12 semanas.

Os animais serão divididos em 06 grupos com 10 animais por grupo.

- a) Grupo 1 serão alimentados com ração padrão.
- b) Grupo 2 serão alimentados com ração padrão e tratados com zinco.
- c) Grupo 3 serão alimentados com ração padrão e tratados com ômega-3.
- e) Grupo 4 serão alimentados com ração hipercalórica.
- f) Grupo 5 serão alimentados com ração hipercalórica e tratados com zinco.
- g) Grupo 6 serão alimentados com ração hipercalórica e tratados com ômega-3.

A determinação do número de animais foi baseada em dados da literatura e em cálculo amostral para um nível de significância de 95% e um erro amostral de 5% considerando como desfechos o ganho de peso, o aumento do tecido adiposo abdominal e os níveis de triglicerídeos plasmáticos, determinou-se um “n” de 10 animais por grupo (Souza et al., 2005; Du Toit et al., 2008; Estadella et al., 2011).

O ômega-3 ou o zinco serão administrados por gavagem diariamente durante 4 semanas a partir da 8ª semana da administração da dieta hipercalórica, sendo que o experimento terá duração total de 12 semanas. Os animais serão pesados semanalmente. O ômega-3 será administrado na dose de 500mg/Kg. O zinco será administrado na dose de 10mg/animal/dia. Todos os procedimentos experimentais realizados nos animais estão de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 08.10.2008) segundo as orientações do CEUA da UFCSPA e às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e da Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

Os animais serão anestesiados com 30 mg/Kg de cloridrato de xilasina (Rompum) e 250 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Ketalar).

Primeiramente o sangue será retirado do animal através do plexo retro-orbital. Os animais serão colocados em decúbito dorsal e permaneceram sob ventilação espontânea, respirando ar ambiente.

Posteriormente, realizar-se-á tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que se iniciará com uma laparotomia ventral média onde será retirado o fígado, gordura visceral e epididimal, músculo gastrocnêmio e sóleo para as análises bioquímicas e histológicas. Os animais sofrerão eutanásia por sobredose de anestésico (dose indicada acima).

2. Obtenção do Plasma e Determinação da Glicemia, Colesterol, Triglicerídeo, Insulina, Leptina,

O sangue será retirado do animal através do plexo retro-orbital e colocado num tubo de ensaio com heparina (Liquemine®), para evitar a coagulação. Após se realizará a centrifugação do material a 3.500 rpm pelo tempo de 10 minutos a 4°C.

O precipitado será desprezado e o soro retirado com pipeta para ser congelado em freezer à temperatura de -20° C para posterior determinação dos índices de glicemia, colesterol, triglicerídeos e insulina.

A avaliação da glicemia, colesterol e triglicerídeos será através de testes enzimáticos colorimétricos Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica. A avaliação da insulina e leptina será através de kit para ELISA. A determinação de IL-1 β , IL-6 e TNF α será através do sistema MILLIPLEX utilizando placa para 3 analitos.

3. Avaliação da estimativa da resistência insulínica pelo índice de HOMA-IR

O índice HOMA-IR (“Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance”) é um cálculo de execução simples, que se fundamenta nas dosagens da insulinemia e da glicemia, ambas de jejum, descrito em 1985 por David Matheus. Sua finalidade é determinar a resistência à insulina. Disponibiliza-se, a seguir, a fórmula utilizada para obtenção de tais índices:

HOMA IR: $\frac{\text{insulina jejum (mcU/mL)} \times \text{glicose jejum (mmol/L)}}{22,5}$

22,5

4. Análises Anatomopatológicas

Para o exame histológico, o fígado e o músculo serão incluídos em blocos de parafina, sendo posteriormente cortado em micrótomo rotativo na espessura de 5µm. Serão realizadas as técnicas de coloração por Hematoxilina-Eosina, o qual evidencia dano no tecido e coloração por Picrosírius, que evidencia o colágeno presente avaliando o grau de fibrose.

5. Imunoistoquímica para IL1, IL6 e TNF α Tecido Hepático e Muscular

Para a realização das análises histológicas, os tecidos (fígado e músculo esquelético- gastrocnêmio e sóleo) dos animais serão colocados em uma solução de zinco fixadora por 48 horas. Após, as peças serão desidratadas, diafanizadas e incluídas em bloco de parafina. Cortes seriados de 8 µm de espessura serão realizados em micrótomo.

Para a imunohistoquímica, os cortes inicialmente receberão uma série de pré-tratamentos para bloquear a atividade da peroxidase endógena e alguns sítios inespecíficos de união dos anticorpos antes da incubação com os anticorpos primários. A incubação terá duração de 24 horas. Em sequência, os cortes serão lavados em PBS-T (tampão fosfato salino com 0,02% de triton), sendo, logo após, incubados com o anticorpo secundário na diluição de 1:100 em PBS-T. A incubação será realizada à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após, os cortes serão novamente lavados em PBS-T e incubados em uma solução de PAP (peroxidase antiperoxidase) com diluição de 1:500 em PBS-T, durante 90 minutos, à temperatura ambiente. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, o qual, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. Este complexo de reação será revelado pelo método histoquímico, empregando o cromógeno 3-3'diaminobenzidina (DAB), que ao combinar-se com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), resulta no complexo HRP.H₂O₂, o qual adquire cor. Para isso, será utilizada uma solução de DAB 0,06% em PBS e uma solução de H₂O₂ 10% em água deionizada. Os cortes serão incubados por 10min na solução de DAB, sendo acrescentado, logo em seguida, 0,005% de solução de H₂O₂. Esses cortes permanecerão neste meio até o aparecimento de um precipitado de cor parda, o qual ocorre em torno de 10 minutos. Depois da revelação, os cortes serão contra-corados com hematoxilina-eosina e posteriormente cobertos com Entellan (Merck) e lamínulas. A análise das imagens obtidas será qualitativa e qualitativa.

6. Western Blot

Será usado a técnica de western blot para determinar a expressão das subunidades do NFkB (p65), iNOS, PPAR, mTOR, TLR4, p-AKT e miostatina utilizando um sistema descrito por Laemli. Em primeiro lugar, será realizado um homogeneizado de tecido em um tampão de lise (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0) onde se adicionam os inibidores das proteases. O homogeneizado será incubado durante 30 minutos a 4°C e centrifugado a 13.000 xg durante 30 minutos a 4°C, retirando o sobrenadante e alicotando a amostra. A proteína adequada será adicionada a uma solução (H₂O, tris/HCl 0,5 M, DDT 1% e azul de bromofenol) e será incubada durante 5 minutos a 100°C. Depois será realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 9-12% em tampão de electroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH 8,8). Depois de separadas, e afim de verificar o procedimento, introduz-se a membrana de nitrocelulose em uma solução de vermelho Ponceau para visualizar as proteínas totais. A membrana será lavada com agitação durante 5 minutos com água e durante outros 5 minutos com PBS. Depois coloca-se durante 30 minutos em solução de bloqueio (4% de leite em pó desnatado em PBS-Tween frio) a 37° C. A membrana será incubada toda a noite com os anticorpos específicos para as proteínas anteriormente relacionadas de ratos obtidos em coelho ou cabra (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA; Biomol Internacional, Plymouth, PA; Abcam, Cambridge, UK y Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Transcorrido este período será lavado quatro vezes com PBS-Tween, realizando mais uma lavagem adicional com PBS 1x. Posteriormente, será incubado com um anticorpo anti-inmunoglobulina de coelho unido a HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca) e se detectam as proteínas mediante quimiluminescência utilizando o kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). A densidade das bandas específicas será quantificada com um densitômetro de imagen (Scion Image, Maryland, MA).

7. Análise Estatística

Os dados quantitativos gerados serão descritos por média e desvio padrão. Na presença de assimetria será realizada transformação logarítmica dos mesmos. A comparação dos grupos será realizada pelo procedimento de análise de variáveis de medidas repetidas ou de acordo com o modelo experimental por ANOVA de duas vias.

Na localização de diferença será utilizado o teste de Tukey e os dados analisados com o programa SPSS 13.0 (*Statistical Package for Social Science*).

F) RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

- 1- Formação de recursos humanos: 1 mestre e 1 doutor vinculados ao PPG Biociências da UFCSPA, orientações de iniciação científica nos cursos de farmácia e biomedicina da UFCSPA com apresentação de dois trabalhos de IC/ano.
- 2- Publicação de artigos científicos em revistas de impacto: 2 artigos ao final do projeto.

Como impactos da pesquisa:

- 1- Obtenção de dados relevantes sobre sarcopenia da obesidade e da possibilidade de inclusão nas avaliações nutricionais do uso de suplementos com potencial de reversão ou tratamento deste quadro.
- 2- Formação de profissionais farmacêuticos e biomédicos capacitados para o trabalho de pesquisa com capacidade de análise e pensamento crítico.

G) CRONOGRAMA, RISCOS E DIFICULDADES

CRONOGRAMA

O projeto está previsto para ser realizado em 36 meses. O cronograma está dividido em semestres.

	2023	2023	2024	2040	2025	2025
	1ºsem	2ºsem	1ºsem	2ºsem	1ºsem	2ºsem
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Obtenção dos animais		X			X	
Desenvolvimento do modelo experimental	X		X			
Dosagens bioquímicas	X	X	X	X		
Análise histológica HE e imunohistoquímica		X	X	X	X	
Avaliação das citocinas no sangue		X	X	X		

Técnica Western blot		X	X	X	X	
Análise dos dados e elaboração de artigo científico		X	X	X	X	X

Os riscos e dificuldades do trabalho estão no longo período de manutenção dos animais e administração da dieta o que gera uma maior variabilidade dos dados. Também é um risco importante a dificuldade na obtenção de financiamento para pesquisa e de bolsa para os alunos de mestrado e doutorado.

H) ORÇAMENTO

Ítems	Valor (R\$)
1- Soluções e reagentes como anestésicos, soluções tampão, solução fisiológica, plásticos e outros	950,00
2- Reagentes e material para a avaliação histológica e imunohistoquímica.	3.097,00
3- Kits para avaliação de glicemia, TG, colesterol, insulina, leptina	8.900,00
3- Reagentes e soluções para análise molecular (western blot)	10.700,00
4- Anticorpos	23.345,00
5- ômega-3	2.000,00
6- Ração controle e hipercalórica	9.200,00
TOTAL	59.192,00

I) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baumgartner, R. N. (2000). Body composition in healthy aging. Ann. N. Y. Acad. Sci. 904, 437–448. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06498.x

Beavers KM, Hsu FC, Houston DK, Beavers DP, Harris TB, Hue TF, Kim LJ, Koster A, Penninx BW, Simonsick EM, Strotmeyer ES, Kritchevsky SB, Nicklas BJ; Health ABC

Study. The role of metabolic syndrome, adiposity, and inflammation in physical performance in the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68: 617-623 [PMID: 23109678 DOI: 10.1093/gerona/gls213]

Brasil. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil. 2016

Calder P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. v.77: 327-335, 2007.

Calder P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* 2017.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys Acta* v.1851:469-484, 2014.

Catalán-Latorre A, Pleguezuelos-Villa M, Castangia I, Manca ML, Caddeo C, Nácher A, et al. Nutriosomes: prebiotic delivery systems combining phospholipids, a soluble dextrin and curcumin to counteract intestinal oxidative stress and inflammation. *Nanoscale* [Internet]. 2018.

Collins KH, Herzog W, MacDonald GZ, Reimer RA, Rios JL, Smith IC, Zernicke RF and Hart DA (2018) Obesity, Metabolic Syndrome, and Musculoskeletal Disease: Common Inflammatory Pathways Suggest a Central Role for Loss of Muscle Integrity. *Front. Physiol.* 9:112. doi: 10.3389/fphys.2018.00112

Collins, K. H., Paul, H. A., Hart, D. A., Reimer, R. A., Smith, I. C., Rios, J. L., et al. (2016c). A high-fat high-sucrose diet rapidly alters muscle integrity, inflammation and gut microbiota in male rats. *Sci. Rep.* 6:37278. doi: 10.1038/srep37278

Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* v.18, (2645): 1-18, 2017.

Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M; European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010; 39: 412-423 [PMID: 20392703 DOI: 10.1093/ageing/afq034]

Delmonico MJ, Harris TB, Lee JS et al. Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 769–74.

DiBonaventura MD, Meincke H, Lay A Le, Fournier J, Bakker E, Ehrenreich A. Obesity in Mexico : prevalence , comorbidities , associations with patient outcomes ,

and treatment experiences. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2018;1–10.

Drake I, Hindy G, Ericson U, Orho-Melander M. A prospective study of dietary and supplemental zinc intake and risk of type 2 diabetes depending on genetic variation in SLC30A8. *Genes Nutr.* 2017;12:30.

Elbahrawy A, Bougie A, Loisel S-E, Demyttenaere S, Court O, Andalib A. Medium to long-term outcomes of bariatric surgery in older adults with super obesity. *Surg Obes Relat Dis [Internet].* 2017;1–7

Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci.* v. 116: 1-16, 2009.

Gillies P.J, Bhatia S.K, Belcher L.A, Hannon D.B, et al. Regulation of inflammatory and lipid metabolism genes by eicosapentaenoic acid-rich oil. *J Lipid Res.* v. 53:1679-1689, 2012.

Global Nutrition Report. 2017. Nourishing the SDGs. In Development Initiatives. Bristol, UK.

Gupta S, Richard L, Forsythe A. The humanistic and economic burden associated with increasing body mass index in the EU5. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2015;8:327–38.

Ibitoye OB, Ghali UM, Adekunle JB, Uwazie JN, Ajiboye TO. Antidyslipidemic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of Aqueous Leaf Extract of *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels in High-Fat Diet-Fed Rats. *Evidence-Based Complement Altern Med [Internet].* 2017;2017:1–8.

Kalupahana NS, Claycombe K, Newman SJ, Stewart, et al. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J Nutr.* v.140:1915-22, 2010.

Kamel HK. Sarcopenia and aging. *Nutr Rev* 2003;61(5Pt1):157e67.

Kim H, Hirano H, Eda Hiro A et al (2016) Sarcopenia: prevalence and associated factors based on different suggested definitions in community-dwelling older adults. *Geriatrics & gerontology international* 16(Suppl 1):110–122

Kim HK, Della-Fera M, Lin J, Baile CA. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* v.136:2965-2969, 2006.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a

histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321 [PMID: 15915461 DOI: 10.1002/hep.20701]

Li Q, Zhang Q, Wang M et al. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* v.45(5): 1356-1365, 2008.

Lonnerdal B. Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *Am Soc Nutr Sci*. 2000;1378-83.

Mafrá D, Cozzolino SMF. Importância do zinco na nutrição humana. *Rev Nutr*. 2004;17(1):79-87.

Mathiowetz V, Weber K, Volland G, Kashman N (1984) Reliability and validity of grip and pinch strength evaluations. *J Hand Surg [Am]* 9:222-226.

Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrian S, Martinez JA. Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc*. v.69:324-332, 2010.

Mori T.A, Bao D.Q, Burke V, Puddey I.B, et al. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr*. v.70: 817-825, 1999.

Murphy RA, Ip EH, Zhang Q, Boudreau RM, Cawthon PM, Newman AB, et al. Transition to sarcopenia and determinants of transitions in older adults: a population based study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69(6):751e8

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. v.142:687-98, 2010.

Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes*. 2002;26(9):1159-64.

Olza J, Aranceta-Bartrina J, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G, et al. Reported dietary intake and food sources of zinc, selenium, and vitamins a, e and c in the spanish population: Findings from the anibes study. *Nutrients*. 2017;9(7).

Pedraza DF, Sales MC. Deficiência de zinco : diagnóstico, estimativas do Brasil e prevenção. *Nutrire*. 2015;40(3):397-408.

Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Marcos-Gomez B, Marti A, et al. Downregulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats. *J Nutr Biochem*. v. 20:705-714, 2009.

Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med* [Internet].

1961 Oct 1 [cited 2017 Dec 29];31(4):532–46.

Richard, D. Kefi, K. Barbe, U. Bausero, P. Visioli, F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol. res.* v.57: 451-455, 2008.

Rolland Y, Czerwinski S, van Kan G, Morley JE, Cesari M, Onder G, et al. Sarcopenia: Its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J Nutr Health Aging* 2008;12(7):433e50.

Sanna A, Firinu D, Zavattari P, Valera P. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* [Internet]. 2018;10(1):68. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/1/68>

Santos R.D., Gagliardi A.C.M., Xavier H.T., Magnoni C.D., Cassani R., Lottenberg A.M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(1Supl.3):1-40

Schiavo L, Busetto L, Cesaretti M, Zelber-Sagi S, Deutsch L, Iannelli A. Nutritional issues in patients with obesity and cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2018 Aug 14;24(30):3330-3346. doi: 10.3748/wjg.v24.i30.3330.

Serhan, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 210, 92-101, 2014.

Simopoulos A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* v.70, 560S–569S, 1999.

Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res.* v.65: 211-222, 2012.

Stenholm S, Harris TB, Rantanen T et al. Sarcopenic obesity: definition, cause and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 693–700.

Torkanlou K, Bibak B, Abbaspour A, Abdi H, Saleh Moghaddam M, Tayefi M, et al. Reduced Serum Levels of Zinc and Superoxide Dismutase in Obese Individuals. *Ann Nutr Metab.* 2016;69(3–4):232–6.

van Schothorst EM, Flachs P, Franssen-van Hal NL, Kuda O, et al. Induction of lipid oxidation by polyunsaturated fatty acids of marine origin in small intestine of mice fed a high-fat diet. *BMC Genomics.* v10:110, 2009.

WHO 2016 Obesity and overweight [Internet]. WHO. World Health Organization

Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, et al. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity.* v.38, 1154-1163, 2013.

Zimmermann AM, Kirsten VR. Alimentos Com Função Antioxidante Em Doenças Crônicas : Uma Abordagem Clínica. Disc Sci Série Ciências da Saúde. 2008;9(1):51–68.

Hospital da Criança Santo Antônio
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas.

Projeto de Pesquisa

Bruna Lixinski Diniz
Leonardo Augusto Schreiner
Luiza Emy Dorfman
Maiara Anschau Floriani
Rafael Fabiano Machado Rosa
Paulo Ricardo Gazzola Zen

Porto Alegre, 15 de agosto de 2017.

RESUMO

Embora as doenças genéticas sejam individualmente raras, sua frequência conjunta faz com que elas representem um importante problema de saúde pública. De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos. As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente. A cardiopatia congênita é a alteração congênita mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil relacionadas a malformações congênitas. Com incidência de 19 a 75 casos a cada mil nascidos vivos, possui etiologia complexa e multifatorial, com cerca de 80% das cardiopatias congênitas surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratógenos. As doenças genéticas representam um importante problema de saúde pública, pois, além de provocarem uma enorme proporção de mortes infantis, são a causa de grande parte das internações em hospitais pediátricos.

Atualmente são poucos os exames genéticos realizados via SUS. O presente projeto visa a realização de uma abordagem clínica e genética em pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas. A amostra será composta por pacientes do SUS em ambulatório ou internados atendidos pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA no Hospital da Criança Santo Antônio, com suspeita ou diagnóstico clínico de doença genética ou síndrome malformativa. Para aqueles pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas será coletada uma amostra de sangue para cultivo de células e/ou extração de DNA. O material biológico coletado será processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, compondo um biorepositório que será utilizado para a realização de exames genéticos visando a obtenção do diagnóstico. De modo associado, serão coletadas informações clínicas dos pacientes para o desenvolvimento de trabalhos de conclusão de curso, mestrados e doutorados.

Em um primeiro momento serão disponibilizados testes de FISH e MLPA para microdeleções. A realização de testes genéticos específicos possibilita a obtenção de diagnósticos mais precisos, levando a um planejamento terapêutico mais otimizado, além de diminuir o sofrimento de pacientes e suas famílias. Também gera reflexos em relação a diminuição de custos, agilizando o diagnóstico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGH do inglês, <i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CNV do inglês, <i>copy number variation</i>
DNA do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FISH do inglês, <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
LCR do inglês, <i>low copy repeat</i>
MLPA do inglês, <i>Multiplex Ligation-dependent Probes Amplification</i>
PCR do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SGC do inglês, <i>contiguous gene syndromes</i>
SMM do inglês, <i>microdeletion or microduplication syndromes</i>
SNP do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SV do inglês, <i>structural variation</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Exemplos de síndromes de microdeleções e microduplicações mais comuns.....	8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema explicativo de CNVs recorrentes.....	4
Figura 2 Observações experimentais de rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados a distúrbios genômicos.....	5
Figura 3 Visão geral esquemática de todas as regiões de microdeleção e microduplicação genômica.....	7
Figura 4 Ilustração resumida das etapas da Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	16
Figura 5 Esquema explicativo da técnica de MLPA.....	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos moleculares das microduplicações e microdeleções.....	2
1.2	Síndromes de microdeleções/microduplicações.....	6
1.3	Estratégias para investigação de anomalias genômicas.....	9
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivo geral	12
3.2	Objetivos específicos	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1	Amostra	13
4.2	Extração de DNA.....	14
4.3	Cultura de células de sangue periférico.....	15
4.4	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	15
4.5	Análise de microdeleções/microduplicações pela técnica de MLPA.....	17
4.6	Processamento dos dados e análise estatística	19
4.7	Aspectos Éticos	19
4.8	Riscos e benefícios	20
5	CRONOGRAMA	21
6	ORÇAMENTO	22
7	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde define malformação congênita (anomalia congênita, defeito congênito ou distúrbio congênito) como uma anomalia estrutural ou funcional que se manifesta ainda na vida intrauterina, podendo ser diagnosticada no período pré-natal, no nascimento ou até mesmo, durante a infância (WHO, 2016). As manifestações clínicas podem ser muito diversificadas, podendo apresentar dismorfias leves até alterações complexas e raras, acometendo órgãos ou segmentos corporais (Manual de Anomalias Congênicas, 2012).

Embora as doenças genéticas individualmente possam ser raras, sua frequência conjunta faz com que elas sejam uma parte importante da Medicina. Estima-se que 10 a 12% de todos os indivíduos nascidos vivos irão desenvolver uma doença geneticamente influenciada ao longo de suas vidas (Wilson, 2000). De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos (Robinson e Linden, 1993; Wilson, 2000; Stevenson e Hall, 2006; Turnpenny e Ellard, 2016). As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente (Turnpenny e Ellard, 2016). Em países desenvolvidos, os distúrbios genéticos e as malformações congênicas contribuem com 30% de todas as admissões infantis, e cerca de 40 a 50% de todos os óbitos observados nesta faixa etária (Turnpenny e Ellard, 2016). Além de contribuir na incidência de alguma anormalidade anatômica em 2-3% de nascidos vivos e em 10% natimortos (Jones & Jones, 2013). A cardiopatia congênita (CC) é um conjunto de anormalidades estruturais e funcionais do coração e grandes vasos, que podem surgir durante a embriogênese cardíaca (Fahed et al., 2013). É a alteração congênita mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil relacionadas a malformações congênicas. Com incidência de 19 a 75 casos a cada mil nascidos vivos (Bruneau, 2008), possui etiologia complexa e multifatorial, com cerca de 80% das cardiopatias congênicas surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratógenos (Blue et al., 2012).

Segundo o banco de dados da Vigilância Europeia de Anomalias Congênicas (EUROCAT), no ano de 2004, 18% das mortes neonatais com presença de alguma malformação congênita, tem origem cromossômica. Além disso, foi verificado que anomalias cromossômicas são responsáveis por cerca de 15% das principais síndromes congênicas, sendo associadas a 25% das mortes perinatais na Europa (Zeitlin et al., 2009). Já no Brasil, 37% das internações

pediátricas nos sistemas de saúde terciários são representativos de algum defeito congênito ou enfermidade genética (Horovitz et al., 2005). Além disso, essas alterações são ainda responsáveis pela elevação das taxas de cesarianas e nascimentos de recém-nascidos prematuros (Guerra et al., 2008).

Em relação à etiologia para essas malformações, já foram identificadas causas como, mendelianas, cromossômicas, ambientais, entre outros. Porém, muitas vezes é difícil explicar a causa exata dessas doenças. Sugere-se que 6% das malformações congênitas estejam relacionadas a anomalias cromossômicas, podendo esta proporção aumentar quando associado a desequilíbrios genômicos abaixo da resolução (<5Mb), não sendo estes, possíveis de diagnosticar a partir da análise cromossômica padrão. (Schinzel, 2002). As anormalidades cromossômicas no período pré-natal podem variar desequilíbrios genômicos em nível de poliploidia até aneuploidia. Além disso, microdeleções e microduplicações submicroscópicas também podem estar presentes, as quais só são analisadas por métodos mais sofisticados de diagnóstico citogenético, como por exemplo, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou microarray cromossômico (CMA) (Wellesley et al., 2012). As anomalias congênitas podem contribuir para a incapacidade motora de longo prazo, o que pode resultar em impactos significativos nos indivíduos acometidos, além dos familiares, sistemas de saúde e da sociedade como um todo. Com isso, é importante que se faça um diagnóstico completo de cada síndrome, obtendo um maior número de informações possíveis a fim de proporcionar melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes. Assim, a partir de uma atenta avaliação clínica se pode traçar uma estratégia de investigação visando a otimização do uso dos diferentes testes genéticos.

1.1 Aspectos moleculares das microduplicações e microdeleções.

A caracterização das síndromes genéticas se originou através da junção dos achados clínicos comumente encontrados em pacientes afetados, e na capacidade de detectar anormalidades cromossômicas por análise citogenética clássica e molecular. As deleções e duplicações cromossômicas parciais se destacam pela importância para a variabilidade do genoma, podendo ser ou não, patogênicas (Redon et al., 2006). Desde os anos 80, as microduplicações e as microdeleções vêm sendo associadas às formas sindrômicas de deficiência intelectual (DI) e atraso do desenvolvimento (AD) (Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG, 1986). Há aproximadamente 10 anos, estudos começaram a reconhecer a variação abundante de uma classe de tamanho intermediário, conhecida como variantes estruturais (SV),

nas quais possuem uma alta relevância quando associadas a desequilíbrios das dosagens gênicas no genoma em pacientes com malformação congênita ou atraso de desenvolvimento (International HAPMAP Consortium, 2005).

As microduplicações cromossômicas e as microdeleções constituem uma porção de variantes de número de cópias (CNVs) que está relacionada com segmentos de DNA, cujo o número de cópias de um indivíduo se mostra variável devido à perda ou ao ganho de material genético, em relação ao genoma de referência (Sebat et al., 2004; Itsara et al., 2009). O tamanho dessas variantes é >50 pares de bases (pb), nas quais possuem mais pares de bases polimórficas quando comparadas aos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Elementos menores são conhecidos como inserções ou exclusões (MacDonald et al., 2014). A detecção das microduplicações e microdeleções permite identificar rearranjos cromossômicos e CNVs, nos quais estão envolvidos numa parcela significativa das anomalias congênitas. Cerca de 1 – 1,7% de gestantes com idade avançada possuem CNVs patógenas, o que significaria um frequência muito maior comparada a incidência de casos de síndrome de Down. (Van den Veyver et al., 2009; Hillman et al., 2013).

Os rearranjos cromossômicos se originam por dois mecanismos principais, podendo ser balanceados ou desbalanceados. O que difere entre os dois é se há perdas ou ganhos de material genético, embora tenha ocorrido algum rearranjo. No caso, as CNVs estão envolvidas nos rearranjos desbalanceados que podem estar associados a deleções/duplicações, ou a herança de produtos de translocações não balanceadas. Além disso, ambos mecanismos demonstram ter impactos na expressão de genes (Harewood et al., 2012). As CNVs podem ser classificadas em variações benignas, patogênicas ou variações de significância incerta (VOUS), com isso, muitas dessas podem estar associadas a síndromes ou basicamente a deficiências neurocognitivas, como autismo ou atraso do desenvolvimento (Gross et al., 2011).

As CNVs estão estabelecidas em duas classes: as recorrentes e as não recorrentes, ambas mediadas por diferentes mecanismos na formação de rearranjos estruturais (Klopocki & Mundlos, 2011). As variações recorrentes originam-se a partir de recombinações homólogas não-alélicas (NAHR), onde são mediadas por repetições com números de cópias reduzido, conhecidas como LCRs (low-copy repeats) (Figura 1). Os rearranjos genômicos mais recorrentes são causados por NAHR entre duas LCRs. As LCRs são regiões específicas do DNA que possuem geralmente o tamanho de 10-300 kilobases (kb) e 95-97% de similaridade entre si (Shaw & Lupski, 2004; Bailey & Eichler, 2006). Com isso, os pontos de quebra se agrupam em regiões definidas e a extensão das CNVs recorrentes é idêntica em indivíduos distintos (Lupski & Stankiewicz, 2005; Lindsay et al., 2006). Esse tipo de recombinação está

fortemente associado a doenças genômicas, com aproximadamente 37 regiões do genoma já evidenciadas (Liu et al., 2012).

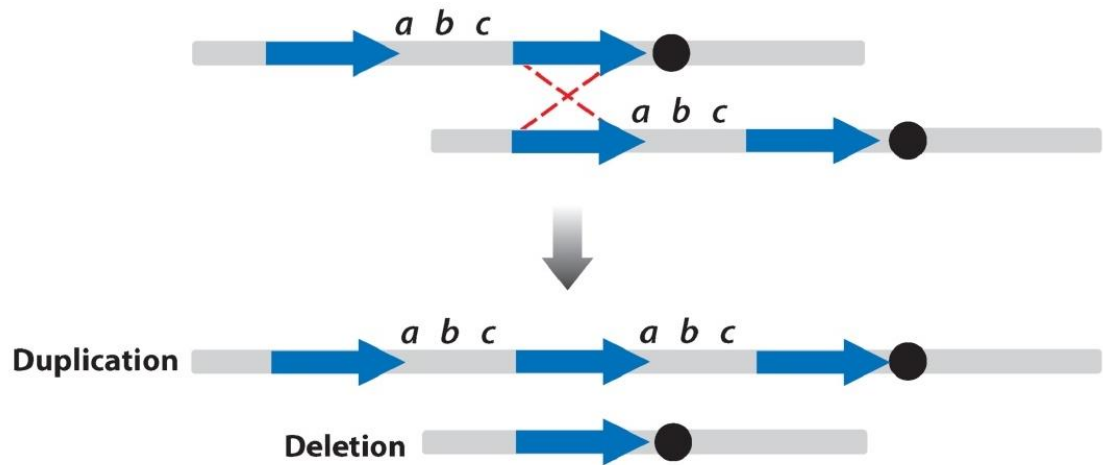


Figura 1. As LCRs representam regiões de sequência altamente repetitivas de baixa cópia que podem fornecer um substrato para rearranjos cromossômicos mediados por NAHR. As setas azuis exemplificam duas grandes duplicações de uma sequência de alta similaridade que flanqueia uma região contendo genes a, b e c. Seguindo o desalinhamento dos homólogos, estas duplicações facilitam as NAHR durante a meiose, auxiliando um evento crossing-over entre duplicações segmentares parálogas, em vez de alélica. Isso resulta em dois produtos recíprocos: um cromossomo que transporta uma duplicação da região intermediária e uma cópia adicional dos genes a, b e c; e um segundo cromossomo que contém uma deleção dessa mesma região. Tais rearranjos são causas comuns de muitos distúrbios genômicos recorrentes, caracterizados por rearranjos recíprocos de regiões cromossômicas específicas. Adaptado de Watson et al., 2014.

As CNVs não recorrentes possuem sequências com similaridade mais limitada que flanqueiam os pontos de quebra, contendo apenas 2-15 pb em sua estrutura. Estes rearranjos podem ocorrer em regiões ricas em LCRs, alterando a arquitetura genômica por estarem em sentido invertido nas sequências de DNA (Stankiewicz et al., 2003; Hastings et al., 2009). Além disso, os rearranjos não recorrentes compartilham uma região genômica comum de sobreposição (SRO, *smallest region of overlap*), que abrange o locus associado ao transtorno genômico (Figura 2) (Gu et al., 2008).

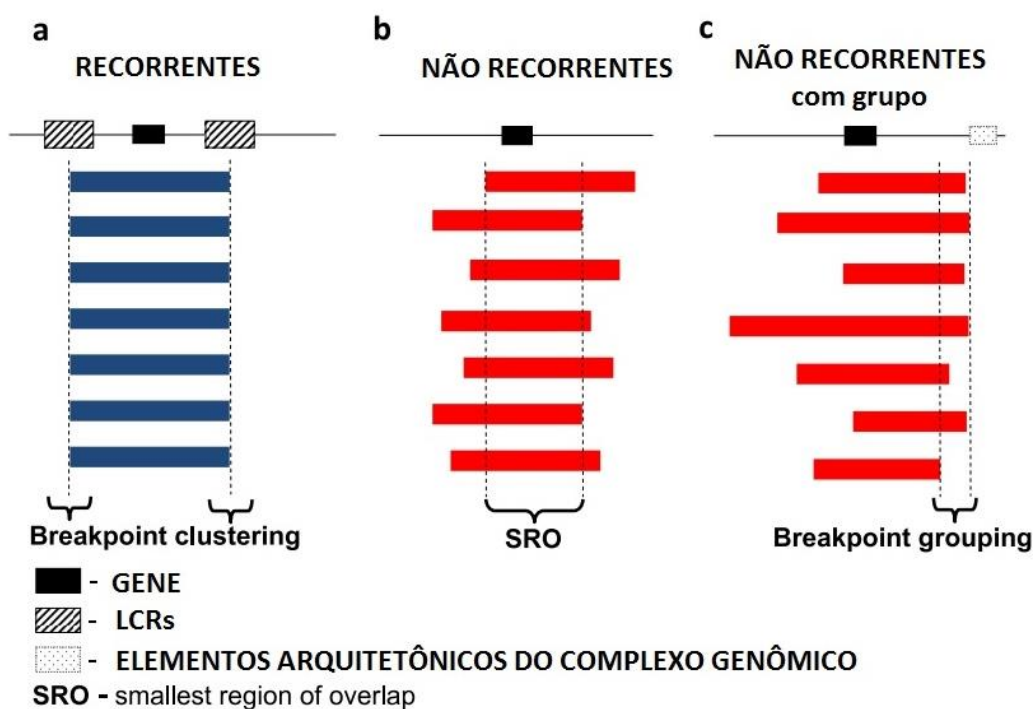


Figura 2. Observações experimentais de rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados a distúrbios genômicos. A linha longa e fina significa a região genômica submetida a rearranjos genômicos. O retângulo preto representa um gene que está localizado na região reorganizada e pode ser afetado pelos rearranjos. As barras de azul escuro (em **a**) e vermelho (em **b** e **c**) representam os rearranjos (duplicações, eliminações ou inversões) com seus pontos de interrupção. **a.** Rearranjos recorrentes com um tamanho comum e pontos de quebra agrupados. A maioria dos rearranjos recorrentes resulta da recombinação homóloga não alélica (NAHR). Os dois retângulos listrados que flanqueiam o gene, retratam as repetições de baixa cópia (LCRs) funcionando como substratos para NAHR. Os pontos de quebra do rearranjo são agrupados dentro dos LCRs. **b.** Rearranjos não recorrentes. Os pontos de quebra dos rearranjos não recorrentes são dispersos na região genômica. Nota-se que todos os rearranjos compartilham uma região genômica comum de sobreposição (SRO), que engloba um gene necessário para o traço fenotípico transmitido, o que permite que esses rearranjos sejam determinados. **c.** Rearranjos não recorrentes com agrupamento de um ponto de interrupção. Alguns dos rearranjos não recorrentes têm um de seus pontos de quebra localizados em uma pequena região genômica. Este agrupamento de pontos de quebra é distinto do agrupamento do rearranjo recorrente, mas sendo um agrupamento de quebra, pode refletir na arquitetura genômica subjacente (por exemplo, palíndromo ou cruciforme) importante para o mecanismo de rearranjo, representado como o retângulo pontilhado na Figura 2c. Adaptado de Gu et al., 2008.

As CNVs podem estar presentes em sequências de um gene ou em um gene inteiro, em um segmento contendo vários genes ou, em elementos regulatórios. As variantes intragênicas podem possuir consequências similares as mutações de ponto patogênicas, sendo que as CNVs maiores podem levar a síndromes de genes contíguos devido a sua possível inclusão em múltiplos genes. Com isso, essas variantes estão sendo associadas com o surgimento de doenças devido à influência em alterações de funções fisiológicas (Lee & Scherer, 2010). A expressão

gênica nas regiões de CNVs está fortemente relacionada ao número de cópias de genes, ou seja, quanto maior concentração das variantes maior vai ser a expressão dos genes. Já para deleções, observa-se o oposto desse mecanismo (Stranger et al., 2007; Schlattl et al., 2011).

Há também, genes que podem modificar a sua expressão pelo fato de estarem próximos aos pontos de quebra e presentes em número de cópias normais, como por exemplo, as microdeleções do cromossomo 7q11.23 responsáveis pela síndrome de Williams-Beuren (WBS). Deleções e duplicações relacionadas a alterações na expressão gênica para CNVs também estão sendo citadas em estudos em humanos e camundongos, nas regiões 16p11.2 e 17p11.2, respectivamente (Merla et al., 2006; Ricard et al., 2010; Jacquemont et al., 2011). A herança de produtos não balanceados dos rearranjos cromossômicos, como as translocações, é uma das causas para a origem das alterações nos números de cópias do genoma. Além disso, como resultado, podem-se observar grandes ganhos ou perdas de regiões cromossômicas (Harewood et al., 2010). Portanto, as duplicações e deleções podem influenciar nos níveis normais de expressão gênica, alterando o número de cópias de um gene e assim, resultando em um produto genético diferenciado, além de exercer um efeito em outros genes que estão próximos ou distantes dos pontos de quebra. Possivelmente há também, alteração no tempo e na localização em que há a expressão. Através disso, observa-se a importância do estudo das CNVs em relação à expressão gênica, levando em conta todos os efeitos espaciais e temporais já relatados (Harewood & Fraser, 2014).

1.2 Síndromes de microdeleções/microduplicações.

As pesquisas comparativas entre malformações congênitas e alterações cromossômicas tiveram seu início no ano de 1956, quando o pesquisador Jerome Lejeune identificou um cromossomo 21 adicional, em pacientes com síndrome de Down (Lejeune et al., 1956). A partir dessa descoberta juntamente com o auxílio da citogenética básica e molecular, o tratamento para esses pacientes e o aconselhamento genético foram beneficiados. As microdeleções e microduplicações foram inicialmente detectadas através da criação das técnicas moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se observaram rearranjos menores que antes não eram possíveis de detectar em técnicas menos sofisticadas, como o bandamento G (Krantz & Spinner; 2007).

As síndromes de microdeleções/microduplicações (SMM) originam-se de variações submicroscópicas no número de cópias de uma região do genoma, que por sua vez causam ganhos ou perdas subcromossômicas específicas. Esses distúrbios podem ser chamados de

síndromes de genes contíguos (SGC). As SGCs possuem regiões críticas de dois ou mais genes, com localização próxima, que são responsáveis por anomalias congênitas, atraso do desenvolvimento e transtornos neuropsiquiátricos (Deak et al., 2011). Estatisticamente, para cada síndrome de microdeleção deve haver uma síndrome de microduplicação recíproca, onde uma comparativa atual realizada no ano de 2012, entre as duas alterações cromossômicas, mostra uma relação de 211 microdeleções versus 79 microduplicações relatadas (Weise et al., 2012), conforme demonstrada na Figura 3.

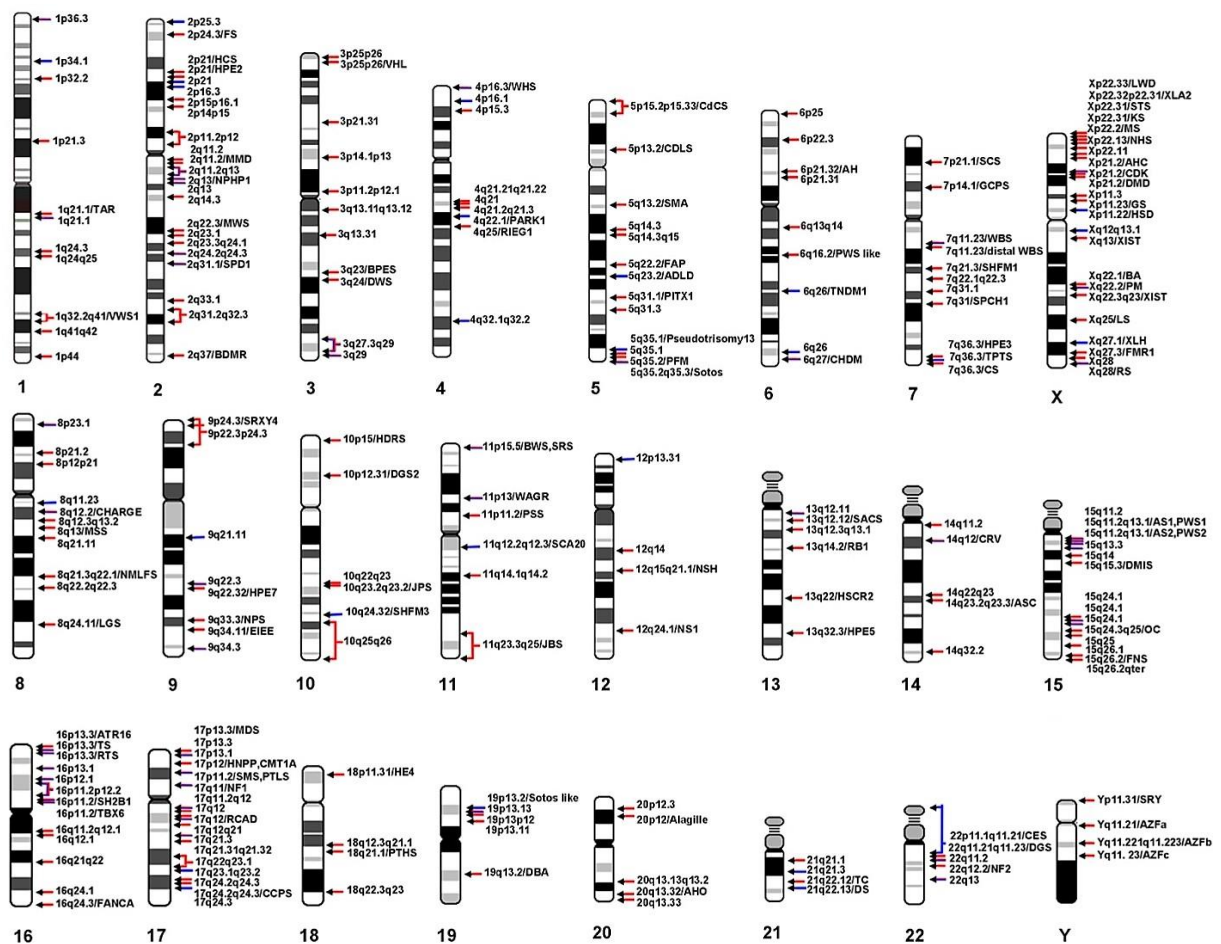


Figura 3. A visão geral esquemática de todas as regiões de microdeleção e microduplicação genômica, já relatadas. As setas vermelhas indicam microdeleções, as setas azuis indicam microduplicações e regiões mistas de vermelho / azul indicam microduplicação e microdeleção recíproca. Adaptado de Weise et al., 2012.

Exemplificando as SMMs, podemos citar a síndrome de DiGeorge, também conhecida como Velocardiofacial (del22q11.2) (Oskarsdottir et al., 2004), síndrome de Williams-Beuren (del7q13) (Schubert, 2009), síndrome de Prader-Willi/Angelman (del15q11-13) (Buiting, 2010), e síndrome de Duplicação 1q21.1 (Brunetti-Pierri, 2008), a qual possui um fenótipo bem parecido com a Velocardiofacial, entre outras (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de síndromes de microdeleções e microduplicações mais comuns.

Síndromes	Rearranjo cromossômico	Região crítica cromossômica		Incidência (nascimentos)
Microdeleção 1p36	Deleção	1p36		1 em 5.000–10.000
Microdeleção 3q29	Deleção	3q29		Não informada
Wolf-Hirschhorn	Deleção	4p16.3		1 em 50.000
Cri-du-chat	Deleção	5p15		1 em 20.000–50.000
Sotos	Deleção	5q35.3		1 em 5000–10,000
Willams-Beuren	Deleção	7q11.23		1 em 7.500 (del)
	Duplicação	7q11.23		Não informada (dup)
Kleefstra	Deleção	9q34.3		<1 em 1 milhão
Beckwith-Wiedemann	Duplicação	11p15		Não informada
Jacobsen	Deleção	11q24.1/24.3/25		1 em 100.000
Prader-Willi	Deleção	15q11.2-q13 (paterno)		1 em 10.000–30.000
Angelman	Deleção	15q11.2-q13 (materno)		1 em 12.000–20.000
Rubenstein-Taybi	Deleção	16p13.3		Não informada
Miller-Dieker	Deleção	17p13.3		Não informada
Microduplicação 17p13.3	Duplicação	1	7p13.3	<1 em 1 milhão
Smith-Magenis	Deleção	17p11.2		1 em 25.000
Potocki-Lupski	Duplicação	17p11.2		Não informada
Charcot-Marie-Tooth, tipo 1 (A)	Duplicação	17p11.2-p12		Não informada
Koolen-de Vries	Deleção	17q21.31		1 em 16.000
Alagille	Deleção	20p11.2-p12		Não informada
DiGeorge/Velocardiofacial	Deleção	22q11.2		1 em 2.000 –4.000
DiGeorge 2 (10p13-p14 deletion)	Deleção	10p13 pter		1 em 200.000
Distrofia muscular de Duchenne	Deleção	Xp21		Não informada

Adaptado de Crotwell & Hoyne, 2012; Vialard et al., 2012; Grati et al., 2015.

1.3 Estratégias para investigação de anomalias genômicas.

O início da citogenética clássica deu-se no final do século 19, através da realização de análises microscópicas de cromossomos em células de carcinoma e sarcoma (Arnold, 1879). A partir de então, com o descobrimento de técnicas mais aprimoradas com o intuito de aumentar a resolução dos cromossomos, a citogenética humana tornou-se não só uma ciência valiosa, como uma estratégia de diagnóstico tradicional para detecção de anormalidades cromossômicas pré-natais, pós-natais e adquiridas (Riegel, 2014). A primeira visualização de padrão de bandas cromossômicas foi através do método de bandamento Q (Caspersson et al., 1968), e logo após, desenvolveu-se a técnica mais usada em tempos atuais, o bandamento G (Seabright, 1971). A cariotipagem com bandamento G é considerada padrão-ouro para análises de doenças cromossômicas, como aneuploidias, trissômicas ou monossomias, além de grandes rearranjos estruturais (>5-10Mb). Esta metodologia baseia-se em cultura de células que varia de 3 a 5 dias, com uso de uma enzima proteolítica (tripsina), associado com a confecção de lâminas, coloração de Giemsa e análise microscópica que possibilita a visualização habitual de um padrão de 450 a 550 bandas nos cromossomos. No entanto, a técnica não possibilita a visualização de alterações pequenas, a nível submicroscópico (Bui, 2007).

A introdução e aplicação de abordagens moleculares aprimoraram a resolução da análise de cromossomos, resultando na obtenção rápida de resultados e detecção mais precisa de anormalidades cromossômicas. A FISH foi à primeira metodologia aplicada na pesquisa citogenética (Gall e Pardue, 1969; John et al., 1969), além de ser atualmente uma das principais técnicas para diagnósticos clínicos e análises de pequenas deleções e duplicações (El-Ella et al., 2012). Através da hibridização do DNA alvo com sondas fluorescentes, esta técnica permite identificar cromossomos envolvidos em aneuploidias e rearranjos cromossômicos, podendo ser obtido o resultado em 48h. Por mais que esta abordagem seja de nível mais elevado, a capacidade de detecção é considerada limitada, pois dependendo dos conjuntos de sondas escolhidas, as alterações podem não ser possíveis de análise (Shaffer et al., 2007). Importante salientar que para uma boa análise, tanto de FISH padrão como o avançado, deve-se usar um microscópio de fluorescência bem mantido e calibrado, equipado com conjuntos de filtros ópticos apropriados para os fluoróforos usados e um sistema de gravação de imagens (Liehr, 2009).

Outra tecnologia muito destacada pela pesquisa atual, que permite detectar rearranjos cromossômicos muito pequenos, é a Hibridização Genômica Comparativa por Array (aCGH). Inicialmente esta abordagem era feita para identificar desequilíbrios cromossômicos através da

detecção de CNVs em tumores, no intuito de distinguir genes que poderiam estar envolvidos na patogênese do câncer (Cai et al., 2002; Albertson & Pinkel, 2003). Pouco depois, começou então a ser utilizada como uma poderosa tecnologia genômica, auxiliando o diagnóstico clínico de pacientes que apresentavam atraso mental idiopático, deficiência intelectual (ID), anormalidades congênitas, esquizofrenia e outros transtornos neuropsiquiátricos. Através desta técnica foi possível analisar o genoma inteiro em alta resolução, detectando variações até então desconhecidas, porém mantendo um alto custo para a realização (Lee et al., 2007; Dave & Sanger, 2007).

Em relação à detecção de genes com deleções/duplicações, podemos destacar a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Por ser um método sensível e rápido, simples e econômico, é indicado para caracterizar desordens congênitas e hereditárias, analisando quantitativamente mais de 40 dosagens diferentes de sequências em uma única reação de PCR (Sørensen et al., 2008). Além disso, o MLPA pode analisar até 96 amostras simultaneamente, com resultados em até 24h, seguindo o protocolo descrito em basicamente quatro passos (desnaturação, hibridização do DNA, reação de ligação e amplificação por PCR). Já para interpretação dos resultados, é necessário etapas de separação dos produtos por eletroforese capilar e a análise dos dados por programas específicos. Mais de 300 sondas (probes) estão sendo comercializadas para a investigação de doenças genéticas, porém a técnica é incapaz de detectar rearranjos balanceados e mosaicismos de baixo grau, além de ser sensível a qualidade da amostra de DNA testada (Shouten et al., 2002; Kozłowski et al., 2008; Stuppia et al., 2012).

Adicionalmente e não menos importante, a identificação de síndromes monogênicas pode ser realizada através da identificação de mutações em genes, utilizando técnicas de PCR e sequenciamento, bem como análise do exoma.

2 JUSTIFICATIVA

Embora as doenças genéticas sejam individualmente raras, sua frequência conjunta faz com que elas representem uma parte importante da Medicina. De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos (Robinson e Linden, 1993; Wilson, 2000; Stevenson e Hall, 2005; Turnpenny e Ellard, 2016). As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente (Turnpenny e Ellard, 2016). Em países desenvolvidos, os distúrbios genéticos e as malformações congênitas contribuem com 30% de todas as admissões infantis, e cerca de 40 a 50% de todos os óbitos observados nesta faixa etária (Turnpenny e Ellard, 2016).

As doenças genéticas representam também um importante problema de saúde pública, pois, além de provocarem uma enorme proporção de mortes infantis, são a causa de grande parte das internações em hospitais pediátricos. A falta de disponibilização de exames diagnósticos em genética médica torna difícil a realização de testes genéticos para pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). São poucos os exames genéticos cuja realização aos pacientes do SUS é viável.

Assim, a possibilidade de realização de exames como FISH, MLPA, aCGH/SNP array, sequenciamento de genes ou do exoma é muito dependente de projetos de pesquisa. A realização de testes genéticos específicos possibilita a obtenção de diagnósticos mais precisos, levando a um planejamento terapêutico mais otimizado, além de diminuir o sofrimento de pacientes e suas famílias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar investigação clínica e genética de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas, atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar anomalias genéticas utilizando técnicas como FISH, MLPA, arrayCGH e sequenciamento/exoma;
- Descrever relatos de caso e séries de casos envolvendo indivíduos portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas em periódicos científicos;
- Constituir um repositório de amostras de DNA de indivíduos suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas;
- Possibilitar o acesso a novas tecnologias aos pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas;
- Fornecer laudos aos pacientes sobre os procedimentos diagnósticos realizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

A amostra será composta por pacientes atendidos pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA no Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), que apresentarem suspeita ou diagnóstico clínico de uma doença genética ou uma síndrome malformativa. Os atendimentos em genética são realizados pelos professores da disciplina de Genética Clínica do curso de Medicina e da residência médica em Genética Médica da UFCSPA, Paulo Ricardo Gazzola Zen e Rafael Fabiano Machado Rosa, aos pacientes em avaliação genética hospitalizados ou em ambulatório, atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O atendimento médico em genética consiste na realização de entrevista, exame físico dismorfológico e registro fotográfico. Salientamos que imagens fotográficas são parte essencial do atendimento em genética, constituindo parte dos prontuários da genética médica. Assim, dados gerais dos indivíduos, como sexo e idade, história gestacional, familiar e clínica, como medidas antropométricas, presença de dismorfias, resultados de exames e avaliações complementares, e intercorrências, serão anotados (Anexo A).

A partir do atendimento são geradas hipóteses diagnósticas que orientam a investigação laboratorial. Porém, a maioria dos exames em genética médica ainda não são rotineiramente disponíveis pelo SUS. Para aqueles pacientes suspeitos ou com diagnóstico clínico de doenças genéticas ou síndromes malformativas será coletada uma amostra de material biológico (sangue) para cultivo de células e/ou extração de DNA. As coletas de sangue serão realizadas preferencialmente de modo associado a coleta de algum outro exame de sangue de rotina, evitando punções desnecessárias. O sangue será colocado em frascos com heparina e/ou EDTA e será processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, sob a responsabilidade dos professores Paulo Zen e Rafael Rosa. Assim, esse material irá compor um biorepositório que será utilizado para a realização de exames laboratoriais visando a obtenção do diagnóstico nosológico. Uma vez realizado o diagnóstico, o material será descartado. A composição de um biorepositório se deve ao fato de que as doenças genéticas são muito raras e muitas vezes fatais, tornando impossível de se planejar a coleta de uma série de casos em um intervalo de tempo curto. Ao mesmo tempo a obtenção de financiamento por agência de fomento é facilitada em situações em que o biorepositório já está composto. O biorepositório otimiza a utilização dos reagentes, pois com as amostras disponíveis os testes podem ser

realizados imediatamente sem necessidade de nova coleta. Os procedimentos da pesquisa não irão interferir na rotina dos serviços de assistência à saúde.

Em um primeiro momento poderemos coletar amostras e já oferecer alguns testes para verificação de microdeleções cromossômicas utilizando as metodologias de FISH e de MLPA. Esses testes serão oferecidos aos pacientes em acompanhamento com o serviço e com suspeita de síndrome de microdeleção, entre as quais as síndromes de Prader Willi/Angelmann, Williams e deleção 22q11.2.

Os tamanhos amostrais dos trabalhos originários do presente projeto dependerão do número de pacientes com a condição em estudo. Assim, a partir deles, serão realizados tanto relatos de casos como descrição de séries de casos que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de trabalhos de conclusão de curso, mestrados e doutorados. A amostra será de conveniência.

Critério de inclusão: Pacientes atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas e que aceitem participar do estudo.

Critério de exclusão: Pacientes atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas e que não aceitem participar do estudo.

O atendimento aos pacientes não será prejudicado independente de sua decisão de participar ou não da pesquisa, essa garantia estará explícita no processo de consentimento e no termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (vide Anexos), quando for o caso.

4.2 Extração de DNA

A partir da amostra de sangue em EDTA (tubo Vacutainer com tampa roxa), será realizada a extração de DNA no Laboratório de Citogenética da UFCSPA de acordo com o protocolo PUREGENE (<https://web.emmes.com/study/hbb/public/EN-Gentra-Puregene-Handbook-2011.pdf>). O DNA extraído será armazenado no próprio Laboratório para análise futura.

4.3 Cultura de células de sangue periférico

A cultura de células é baseada no protocolo de Moorhead et al. (1960), seguindo as etapas:

- 1) Cerca de 0,2 mL de sangue periférico heparinizado são adicionadas a tubo de cultura descartável, estéril de 15 mL, contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 50 µL de fitohemaglutinina M e levados à estufa a 37°C por 72 horas;
- 2) Após 72 horas de cultivo adiciona-se colcemide, para uma concentração final de 0,01 µg/mL, centrifugando-se imediatamente, por 5 minutos;
- 3) O sobrenadante é desprezado e o precipitado celular é ressuspenso em 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075M) e levado ao banho-maria a 37°C por 10 minutos;
- 4) São adicionados 0,5 mL de fixativo (metanol:ácido acético glacial - 3:1). Inverte-se o tubo de cultura 2-3 vezes, levando-se à centrífuga por mais 5 minutos; o sobrenadante é desprezado e o precipitado é ressuspenso com toques leves no tubo, com posterior fixação das células pela adição de 5-8 mL de fixativo, misturando-se com pipeta Pasteur;
- 5) A amostra fixada é levada ao freezer (-20°C), onde é armazenada para posterior preparação de lâminas para os procedimentos de FISH.

4.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica envolve 4 etapas críticas que são a desnaturação, hibridização, lavagens rigorosas e detecção (Figura 4) (Hoovers J.M, 1999; Oostlander A.E., Meijer G.A. & Ylstra B., 2004).

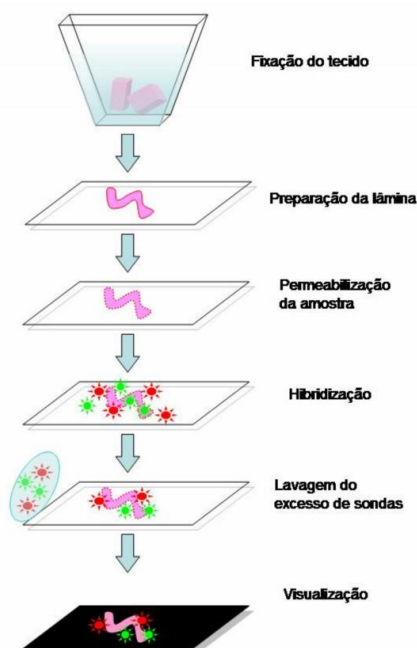


Figura 4 Ilustração resumida das etapas da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Adaptado de Neves & Guedes, 2012.

Para a realização desta metodologia em amostras de suspensão de células fixadas será utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante Abbott Molecular, com aplicação de sondas de DNA marcadas com material fluorescente. Este consiste resumidamente nos seguintes passos:

As amostras a serem estudadas serão as suspensões fixadas obtidas no cultivo de alta resolução. A suspensão é aplicada em lâminas, que são tratadas com 2X SSC e desidratadas em etanol. A sonda de DNA é aplicada à região alvo marcada na lâmina, sendo coberta imediatamente com uma lamínula e selada com cimento de borracha. As lâminas são incubadas em estufa à temperatura de 72-80°C por 2-3 minutos. A seguir, as lâminas são colocadas em uma câmara úmida protegida da luz, em estufa a 37°C, por um período de 16 a 24 horas. Após a hibridização, a lamínula e o cimento de borracha são removidos e as lâminas lavadas sequencialmente em 2X SSC/0,3% Tween 20 a 73°C e em 2X SSC e desidratadas. Ao final, o contra-corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é aplicado às lâminas. Estas são cobertas com lamínulas, deixando-as, a seguir, armazenadas na geladeira a 4°C para posterior análise ao microscópio. A análise será realizada em um microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 Zeiss ou Olympus BX51, ambos disponíveis em nosso laboratório. Em cada caso serão analisadas 20 metáfases e 200 núcleos interfásicos quanto à presença dos respectivos sinais de hibridização das sondas utilizadas. As imagens serão capturadas através de câmera digital de alta resolução acoplada aos microscópios de fluorescência e processadas utilizando-se um software de captura e análise de imagens. As descrições da análise, com a contagem de sinais fluorescentes por metáfase e por núcleo interfásico, serão realizadas em uma ficha padrão.

4.5 Análise de microdeleções/microduplicações pela técnica de MLPA

A MLPA é uma técnica baseada na PCR que realiza uma análise genética semiquantitativa. Possui muitas vantagens como: alta eficiência, facilidade operacional e baixo custo. A MLPA vem sendo aplicada em pesquisas de doenças associadas com CNVs, mutações pontuais e metilação (Zhou & Ren, 2009). É um método sensível, podendo detectar anormalidades no número de cópias do DNA com no mínimo 20 ng de amostra de DNA humano. Nesta técnica, não são as sequências alvo que são amplificadas, mas as sondas que hibridizam com a sequência alvo (Schouten et al., 2002).

Neste estudo serão utilizados o kit *SALSA MLPA probemix P245-B1* (para a detecção de síndromes de microdeleção), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante MRC-Holland. A reação do MLPA é dividida em 5 passos: 1) Desnaturação do DNA e hibridização das sondas de MLPA; 2) Reação de ligação; 3) Reação da PCR; 4) Separação e amplificação dos produtos por eletroforese, e 5) Análise de dados (Figura 2).

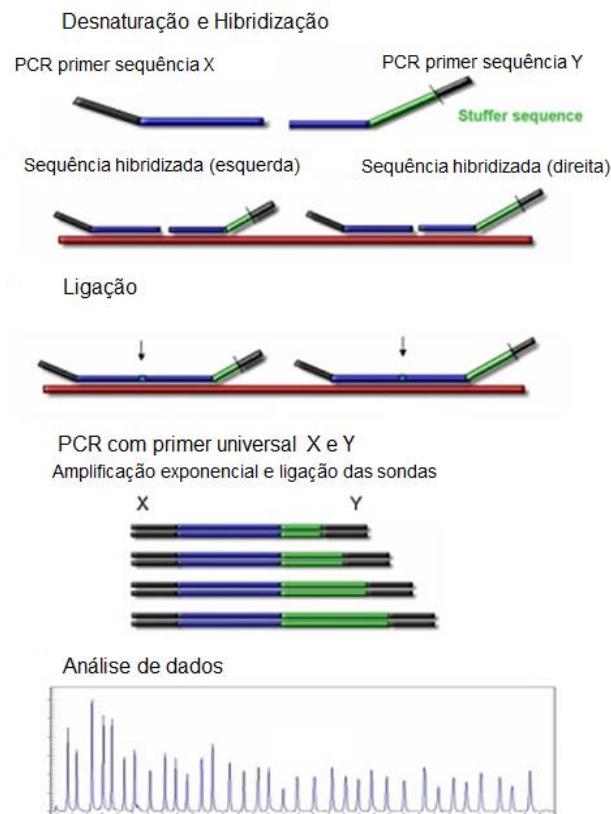


Figura 5. Esquema explicativo da técnica de MLPA. Adaptado de www.mlpa.com

Neste estudo, será diluído de 50 a 100 ng de DNA genômico em 5 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,2 + 0,1 mM de EDTA). É importante que todas as amostras estejam na mesma

concentração para que o resultado não seja duvidoso. As amostras serão desnaturadas no termociclador durante 5 minutos a 98°C e serão deixadas para esfriar a 25°C dentro do equipamento. Serão utilizados tubos controle contendo apenas TE. Serão adicionados 3 µL do mix de hibridização em cada amostra (1,5 µL de *MLPA buffer* (tampa amarela) + 1,5 µL *SALSA probemix* (tampa preta)). As mesmas serão aquecidas por 1 minuto a 95°C, seguido de 16-20 horas a 60°C.

A temperatura será reduzida para 54°C antes de abrir o termociclador. Serão adicionados a cada amostra 32 µL do mix *Ligase-65* para cada amostra (25 µL de dH₂O + 3 µL de *Ligase buffer A* (tampa transparente) + 3 µL de *Ligase buffer B* (tampa branca) + 1 µL da enzima *Ligase-65* (tampa verde)), misturando bem com a pipeta. Serão preparados em menos de 1 hora antes do uso e armazenados em gelo. A seguir, as amostras serão incubadas a 54°C durante 15 minutos (para a ligação) e a 98°C por 5 minutos, para a inativação da enzima pelo calor. As amostras serão resfriadas a 20°C dentro do equipamento, para remoção dos tubos.

Em temperatura ambiente, serão adicionados 10 µL do mix polimerase em cada amostra (7,5 µL de dH₂O + 2 µL de *SALSA PCR primer mix* (tampa marrom) + 0,5 µL de *SALSA Polimerase* (tampa laranja)). As mesmas serão agitadas cuidadosamente com a pipeta e armazenadas em gelo até o uso. Para preparação do mix, deve-se agitar o *SALSA PCR primer mix*, aquecendo a polimerase por 10 segundos na mão, para reduzir a viscosidade. As amostras a seguir serão colocadas no termociclador e será iniciada a reação de PCR: 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, e 60 segundos a 72°C. Ao final, terminar-se-á com 20 minutos de incubação a 72°C, com pausa a 15°C mantendo os tubos fechados para evitar contaminação.

Após a reação de PCR, os tubos serão deixados por 1 hora em um local escuro para diminuir a quantidade de *shoulder peaks* na eletroforese capilar pela adição de nucleotídeos adeninas ao final das cadeias amplificadas. Em seguida, em cada amostra será misturada 0,7 µL da PCR + 0,2 µL de *LIZ GS 500 size standard* ou 0,3 µL de *HOX GS 500 size standard* (Thermo Fisher Scientific) + 9 µL de formamida *Hi-Di*. Aplaca de injeção será selada, sendo a amostra aquecida por 3 minutos a 86°C e resfriada por 2 minutos a 4°C. As amostras serão submetidas à eletroforese capilar no Sequenciador Automático ABI3130, com leitura de comprimento de onda de 488 nm a 650 nm, seguido de análise no software *Gene Mapper* (Applied Biosystems). As amostras deverão ser injetadas no equipamento a 1,6 kilovolt por 15 segundos. A corrida deve ser de 15 kilovolt por 3 minutos.

Os dados brutos gerados pela eletroforese capilar serão importados pelo software *Coffalyser* (MRC-Holland), um programa baseado no Excel, capaz de normalizar todos os

dados e avaliar a qualidade dos scores de cada amostra, auxiliando na interpretação dos resultados. Este programa também é capaz de indicar possíveis erros que ocorreram durante a reação, impedindo que a análise continue ou ainda informando sobre qualquer interferência que possa gerar um resultado duvidoso.

4.6 Processamento dos dados e análise estatística

Os estudos originados do presente projeto (relatos de casos e descrição de séries de casos) serão principalmente descritivos. Para avaliação das características clínicas de grupos maiores de pacientes com um mesmo diagnóstico serão criados bancos de dados nos programas Excel 6.0 e SPSS versão 21.0 para Windows e utilizados testes estatísticos específicos, apropriados para cada situação. Variáveis como idade, sexo, etnia, frequência de características clínicas específicas (como presença, por exemplo, de cardiopatia congênita e anomalias renais) e sobrevida, poderão ser comparadas com as de pacientes com o mesmo diagnóstico descritas na literatura através de testes estatísticos adequados presentes ou nos próprios programas onde os bancos de dados foram formados, ou em programas auxiliares como o PEPI. Isto dependerá somente da variável e do teste estatístico em questão.

4.7 Aspectos Éticos

O atendimento médico aos pacientes do SUS, tanto hospitalizados como em ambulatório, já é realizado no HCSA pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA há mais de 40 anos. Não haverá nenhuma modificação nesse atendimento, independente de os indivíduos serem convidados ou não, e aceitarem ou não, participar do estudo. Também não haverá variação ou influência no número de atendimentos ou nas solicitações de exames complementares disponibilizados pelos diferentes laboratórios do HCSA/ISCOMPA. Ou seja, nenhum exame adicional será realizado às expensas do HCSA/ISCOMPA. Somente serão incluídos na amostra os indivíduos (ou seus responsáveis) que assinarem previamente o termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de assentimento, quando for o caso, para participação na pesquisa (vide Apêndice). A realização dos testes genéticos somente será disponibilizada aos indivíduos com indicação clínica de realização do teste. Para aqueles indivíduos com indicação de realização de teste genético, mas cujo teste ainda não está disponível, como por exemplo arrayCGH e análise do exoma, o material

biológico será coletado, processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Esse material fará parte de um biorepositório que será utilizado assim que os testes estiverem disponíveis e após será descartado. O contato e a coleta das amostras dos indivíduos somente serão iniciados após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCSA.

Após a coleta todos os pacientes serão registrados com a utilização de números, mantendo assim a confidencialidade. Ao final de cada estudo será elaborado um laudo com a descrição dos testes genéticos realizados, bem como seus resultados. Esse laudo será fornecido aos indivíduos ou seus responsáveis durante o atendimento realizado pelos médicos do serviço.

4.8 Riscos e benefícios

O risco físico aos indivíduos está relacionado com a coleta do sangue. Como as coletas serão realizadas de modo associado com as coletas de rotina do hospital, não haverá nenhum risco adicional. O atendimento as possíveis complicações decorrentes da coleta de material se dará do mesmo modo rotineiramente realizado no HCSA.

O material coletado será preservado confidencial, sendo que será sempre assegurado o anonimato dos pacientes envolvidos na pesquisa.

Como benefício direto, o paciente poderá realizar exames genéticos que não são realizados no âmbito do SUS, obtendo laudo diagnóstico descritivo. De modo indireto, a divulgação do conhecimento científico e a transmissão das experiências clínicas vivenciadas pelos mesmos auxiliarão no melhor entendimento das condições genéticas. A participação de alunos no desenvolvimento do projeto contribuirá para a sua formação acadêmica e qualificação profissional. O conhecimento obtido será muito útil no atendimento futuro de pacientes do HCSA.

5 CRONOGRAMA

ANO SEMESTRE ATIVIDADES	2017 2º	2018 1º	2018 2º	2019 1º	2019 2º	2020 1º	2020 2º	2021 1º	2021 2º	2022 1º
Elaboração do projeto	X									
Submissão ao comitê de ética	X									
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta das amostras		X	X							
Execução dos procedimentos laboratoriais		X	X	X	X	X	X	X	X	
Análise e interpretação dos resultados			X	X	X	X	X	X	X	
Defesa de trabalho de conclusão de curso			X				X			
Defesa de dissertação					X			X		
Defesa de Tese										X
Redação de artigos científicos				X		X		X		X

6. ORÇAMENTO

Itens	Valor
CULTURA DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO	
<i>REAGENTES PARA O CULTIVO</i>	R\$ 10.000,00
EXTRAÇÃO DE DNA	
<i>REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA</i>	R\$ 9.000,00
FISH	
<i>SONDAS DE MICRODELEÇÕES/MICRODUPLICAÇÕES E DAPI</i>	R\$ 40.091,00
MLPA	
<i>ANÁLISES POR MLPA</i>	R\$ 40.023,00
TOTAL R\$ 99.114,00	

O financiamento da coleta, processamento, armazenamento das amostras e análise por FISH e MLPA será realizado com os recursos já existentes no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, oriundos de edital PROEXT 2016. A realização de análises complementares se dará a partir da obtenção de recursos de agências de fomento.

7. REFERÊNCIAS

- Abbott Molecular. Disponível em: https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/AbbottMolecular_LSI_FISH_Procedure.pdf. Acessado em: 19.07.2017.
- Albertson, D. G., & Pinkel, D., 2003. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human molecular genetics*, 12(suppl_2), pp.R145-R152.
- Arnold, J., 1879. Beobachtungen über Kerntheilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Archiv*, 78(2), pp.279-301.
- Bailey, J. A., & Eichler, E. E., 2006. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nature reviews. Genetics*, 7(7), pp.552.
- Blue, G.M. et al., 2012. Congenital heart disease: Current knowledge about causes and inheritance. *Medical Journal of Australia*, 197(3), pp.155–159.
- Bruneau, B.G., 2008. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, 451(7181), pp.943–948.
- Brunetti-Pierri, N. et al., 2008. Recurrent reciprocal 1q21. 1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nature genetics*, 40(12), pp.1466-1471.
- Bui, T. H., 2007. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon!. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 30(3), pp.247-251.
- Buiting, K., 2010. Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 154(3), pp.365-376.
- Butler, M. G. et al., 1986. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 23(3), pp.793-809.
- Cai, W. W. et al., 2002. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nature biotechnology*, 20(4), pp.393-396.
- Crotwell, P. L., & Hoyme, H. E., 2012. Advances in whole-genome genetic testing: from chromosomes to microarrays. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 42(3), pp.47-73.
- Deak, K. L. et al., 2011. The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: Variable expressivity and genomic complexity. *Clinics in laboratory medicine*, 31(4), pp.543-564.
- El-Ella, S. S. et al., 2012. Chromosome 22 microdeletion in children with syndromic congenital heart disease by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 13(3), pp.313-322.

- Fahed, A.C. et al., 2013. Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. *Circulation Research*, 112(4), pp.707–720.
- Gall, J. G., & Pardue, M. L., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2), pp.378-383.
- Grati, F. R. et al., 2015. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenatal diagnosis*, 35(8), pp.801-809.
- Gross, S. J. et al., 2011. Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenatal diagnosis*, 31(3), pp.259-266.
- Gu, W. et al., 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 1(1), pp.4.
- Guerra, F. A. R. et al., 2008. Birth defects in Rio de Janeiro, Brazil: an evaluation through birth certificates (2000-2004). *Cadernos de saúde pública*, 24(1), pp.140-149.
- Harewood, L. et al., 2012. Structural variation and its effect on expression. *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols*, pp.173-186.
- Harewood, L. et al., 2010. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome research*, 20(5), pp.554-564.
- Harewood, L., & Fraser, P., 2014. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Human molecular genetics*, 23(R1), pp.R76-R82.
- Hastings, P. J. et al., 2009. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS genetics*, 5(1), p.e1000327.
- Hillman, S. C. et al., 2013. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(6), pp.610-620.
- Horovitz, D. D. G. et al., 2005. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual Birth defects and health strategies in Brazil: an overview. *Cad. saúde pública*, 21(4), pp.1055-1064.
- Hoovers J.M, 1999. Fluorescence in situ hybridization in the study of chromosomal abnormalities [Article in Dutch]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 143, pp.2265-2268.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM et al., 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), p. 1299-1320.
- Itsara, A. et al., 2009. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *The American Journal of Human Genetics*, 84(2), pp.148-161.
- Jacquemont, S. et al., 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11. 2 locus. *Nature*, 478(7367), pp.97.

John, H. A., Birnstiel, M. L., & Jones, K. W., 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223(5206), pp.582-587.

Jones, K. L., Jones, M. C., & Del Campo, M., 2013. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Klopocki, E., & Mundlos, S., 2011. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annual review of genomics and human genetics*, 12, pp.53-72.

Kozlowski, P., Jasinska, A. J., & Kwiatkowski, D. J., 2008. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 29(23), pp.4627-4636.

Krantz, I. D. & Spinner, N. B., 2007. Novel microdeletion syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 145(4), pp. 323-326.

Lee, C., & Scherer, S. W., 2010. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert reviews in molecular medicine*, 12.

Lee, C., Iafrate, A. J., & Brothman, A. R., 2007. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature genetics*, 39, pp.S48-S54.

Lejeune, J., Turpin, R., & Gautier, M., 1959. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, 143(11-12), p.256.

Liehr, T., & Pellestor, F., 2009. Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure. *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 23-34.

Lindsay, S. J. et al., 2006. A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. *The American Journal of Human Genetics*, 79(5), pp.890-902.

Liu, P. et al., 2012. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Current opinion in genetics & development*, 22(3), pp.211-220.

Lupski, J. R., & Stankiewicz, P., 2005. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS genetics*, 1(6), e49.

MacDonald, J. R., 2013. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic acids research*, 42(D1), pp.D986-D992.

Merla, G. et al., 2006. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *The American Journal of Human Genetics*, 79(2), pp. 332-341.

Moorhead, P. S. et al., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental cell research*, 20(3), pp.613-616.

MRC-Holland. Disponível em:

http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_fNPBLedDVp38p-

CxU2h0mQ. Acessado em: 01.07.2017.

Neves, S. M. N., & Guedes, R. M. C., 2012. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79(4), pp.627-632.

Oostlander A.E., Meijer G.A. & Ylstra B., 2004. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.*, 66, pp.488-495.

Oskarsdottir, S., Vujic, M., & Fasth, A., 2004. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Archives of Disease in Childhood*, 89(2), pp.148-151.

Redon, R. et al., 2006. Global variation in copy number in the human genome. *nature*, 444(7118), p.444.

Ricard, G. et al., 2010. Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models. *PLoS biology*, 8(11), e1000543.

Riegel, M., 2014. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. *Genetics and molecular biology*, 37(1), pp.194-209.

Robinson A & Linden M.G., 1993 Clinical genetics handbook. Boston, USA: Blackwell Science.

São Paulo (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. Declaração de Nascido Vivo - Manual de Anomalias Congênitas (2012) 2nd edition. Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, 97 pp.

Schinzel, A., 2002. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. *Chromosome Research*, 10(1), pp.1-4.

Schlattl, A. et al., 2011. Relating CNVs to transcriptome data at fine resolution: assessment of the effect of variant size, type, and overlap with functional regions. *Genome research*, 21(12), pp.2004-2013.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J. & Waaijer, R., 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e:57.

Schubert, C., 2009. The genomic basis of the Williams–Beuren syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(7), pp.1178-1197.

Seabright, M., 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, 298(7731), pp.971-972.

Sebat, J. et al., 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305(5683), pp.525-528.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J. & Waaijer, R., 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e:57

Shaffer, L.G. et al., 2007. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, 145(4), pp.335-345.

Shaw, C. J., & Lupski, J. R., 2004. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human molecular genetics*, 13(suppl_1), pp.R57-R64.

Sørensen, K. M. et al., 2008. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Analytical chemistry*, 80(23), pp.9363-9368.

Stankiewicz, P. et al., 2003. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), pp.1101-1116.

Stevenson, R. E., & Hall, J. G., 2005. Human malformations and related anomalies. *Oxford University Press*.

Stranger, B.E. et al., 2007. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 315, pp.848–853.

Stuppia, L et al., 2012. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), pp.3245-3276.

Turnpenny P. D. & Ellard S, 2016. Emery's Elements of Medical Genetics E-Book, *Genética médica*. 15° ed. Elsevier.

Van den Veyver, I. B et al., 2009. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenatal diagnosis*, 29(1), pp.29-39.

Vialard, F. et al., 2012. Prenatal BACs-on-Beads™: the prospective experience of five prenatal diagnosis laboratories. *Prenatal diagnosis*, 32(4), pp.329-335.

Watson, C. T. et al., 2014. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annual review of genomics and human genetics*, 15, pp.215-244.

Wilson, G., 2000. *Clinical genetics: a short course*. Wiley-Liss.

Weise, A. et al., 2012. Microdeletion and microduplication syndromes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(5), pp.346-358.

Wellesley, D. et al., 2012. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *European Journal of Human Genetics*, 20(5), p.521.

World Health Organization. Congenital anomalies. WHO: 2016. [acesso em 01 de jun de 2017]. Disponível em: www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs370/en/ - 47k

Zeitlin, J., Mohangoo, A. & Cuttini, M., 2009. The European Perinatal Health Report: comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe, pp.681-682.

Zhou, D.-W. & Ren, Z.-R., 2009. Multiplex ligation-dependent probe amplification and its application. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 26(1), pp.45–49.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de Pesquisa

Protocolo de Avaliação

Identificação

1. Ficha (Genética Clínica): _____ 2. Sexo: 1. Masculino 2. Feminino
3. Etnia: 1. Eurodescendente 2. Afrodescendente 3. Mista 4. Outra
4. Idade na primeira avaliação: ____ anos ____ meses ____ dias DN: ____ / ____ / ____
5. Motivo do encaminhamento: _____
6. Encaminhado pelo (Especialidade): _____
7. Idade do pai: _____ 8. Idade da mãe: _____
9. Consangüinidade entre os pais: 1. Sim 2. Não
10. História familiar: 1. Sim 2. Não

Exame físico (1º)

1. Idade: ____ anos ____ meses ____ dias Data: ____ / ____ / ____
 2. Medidas antropométricas (primeira avaliação):
- # Altura: ____ cm (P____) # Peso: ____ Kg (P____) # PC: ____ cm (P____)

3. Exame Físico/Dismorfológico:

I. ANORMALIDADES CRANIOFACIAIS

CRÂNIO: _____

FACE: _____

OLHOS: _____

NARIZ: _____

BOCA: _____

ORELHAS: _____

II. TORAX: _____

III. ABDOME: _____

III. ANOGENITAL: _____

IV. MEMBRO SUPERIOR: _____

V. MEMBRO INFERIOR: _____

VI. PELE E ANEXOS: _____

☐ OUTRAS: _____

Exames e avaliações complementares

1. Avaliação Oftalmológica: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

2. Avaliação Otorrinolaringológica: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

3. Raio-X de Coluna: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

4. Avaliação Cardiológica: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

- Ecocardiografia: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

5. Ecografia abdominal: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

6. Provas de Função da Tireóide: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando? _____ 1. Normal 2. Alterada

Teste do Pezinho? 1. Sim 2. Não

Alteração: _____

7. Outros exames e avaliações: 1. Sim 2. Não

Qual(is): _____

Alteração(ões): _____

8. Resultado do cariótipo (paciente): _____

9. Resultado do cariótipo – pais: _____

10. Óbito: 1. Não 2. Sim. Idade: _____ Causa: _____

ANEXO B – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas” (15 de agosto de 2017)

As doenças genéticas são raras e seu diagnóstico é dependente de testes genéticos. Não existe um teste genético único que possibilite o diagnóstico de todas as doenças genéticas. O médico geneticista orienta a investigação mais adequada para cada indivíduo. O acesso a testes genéticos no Sistema Único de Saúde é muito restrito.

Sendo assim você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada **“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas”**. O objetivo do estudo é realizar investigação clínica e genética de indivíduos com suspeita de doença genética. O estudo será realizado durante seu atendimento de rotina pelos médicos geneticistas do HCSA e não irá alterar o tempo de atendimento. Os dados coletados são relacionados com o atendimento médico, como idade, sexo, história da doença, informações familiares, exame físico e exames já realizados. O único procedimento adicional será a coleta de uma amostra de sangue para a realização dos exames genéticos.

A realização do teste genético pode nos auxiliar a obter o diagnóstico do seu filho. Com a confirmação do diagnóstico podemos realizar o aconselhamento genético e ajustar tratamentos que seu filho possa necessitar. Além disso, o diagnóstico de doenças genéticas é importante para a divulgação e ampliação do conhecimento médico e pode ser de grande auxílio na definição diagnóstica de outros indivíduos com a mesma doença.

Os riscos são associados a coleta do sangue, podendo ocorrer desconforto e sangramento mínimos. Nesses casos a assistência será gratuita e realizada pela própria equipe. Todas as informações coletadas são protegidas pelo sigilo médico. As informações serão colocadas em tabelas e identificadas somente por números. A sua identidade e de seu filho(a) não será revelada.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo casual comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Somente os custos relacionados aos testes genéticos serão cobertos pela pesquisa.

A sua participação e de seu filho(a) é voluntária e a decisão de não participar do estudo não afetará em nada o seu atendimento no hospital. Além disso, você pode desistir da pesquisa a qualquer momento.

O seu nome e de seu filho(a) não serão revelados em momento algum. As informações utilizadas para publicação não permitirão que ele seja identificado. As imagens fotográficas poderão ser utilizadas em publicações, após a assinatura do TCLE, respeitando sempre o anonimato. Os dados serão utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde.

Telefones de contato:

- Investigador principal: Prof. Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen (51) 99982.9322; (51) 33038774.

- Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Criança Santo Antônio – sob coordenação de Catiane Zanin Cabral, telefone 3214.8997 – para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa.

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações fornecidas e que decidiu participar voluntariamente deste estudo. Uma via será entregue a você e outra será arquivada pelo investigador principal.

Nome do Sujeito de Pesquisa (letra de forma)

Data _____

Representante legal

Responsável pela aplicação do TCLE

Data _____

Assinatura

ANEXO C – Termo de assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas”**. Seus pais permitiram que você participe.

Queremos saber **o que tem causado o seu mal estar. Qual o motivo que faz com que você não se sinta bem e necessite realizar consultas e ficar no hospital.**

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de **dias de vida a 17** anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita no **Hospital da Criança Santo Antônio**, onde as crianças **fazem as suas consultas e tratamentos**. Para isso, será usado **sangue**. O uso do **sangue** é considerado seguro, mas é possível ocorrer **desconforto ou sangramento mínimos na coleta**. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones **(51-33038774) (51-999829322)** do pesquisador **Paulo Zen**.

Mas há coisas boas que podem acontecer como **descobrir o motivo que faz com que você precise consultar ou internar no hospital e melhorar o seu tratamento.**

Se você morar longe do **Hospital da Criança Santo Antônio**, nós daremos a seus pais dinheiro suficiente para transporte, para também acompanhar a pesquisa.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa **nós explicaremos para você e seus pais todos os resultados encontrados em seu exame.**

Eu escrevi os telefones acima caso tenha alguma dúvida.

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas”**, que tem o objetivo de **“investigar qual o motivo que faz com que eu precise consultar e internar no hospital”**. Entendi as coisas ruins e as coisas boas

que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Porto Alegre, ____ de ____ de ____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Título da Proposta: Influência da sinalização purinérgica na gravidade de doenças pulmonares virais e bacterianas

Coordenador: Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Instituição executora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Resumo:

Em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) com infecção respiratória, um dos desafios é a diferenciação entre infecção pulmonar viral e bacteriana, além do risco de evolução para sepse e choque séptico que pode ocorrer tanto em infecções bacterianas como naquelas iniciadas por doença viral, como a COVID-19. A COVID-19 é uma doença complexa caracterizada por alterações nos compartimentos da imunidade inata e adaptativa, que afeta não só o número de células, mas também sua funcionalidade. Recentemente, nosso grupo demonstrou que alterações no eixo CD39/CD73 de linfócitos T, bem como redução dos níveis de adenosina extracelular estão associados à gravidade da COVID-19, sendo importante caracterizar e estudar melhor estas alterações em outras células e tecidos e em doenças respiratórias causadas por bactérias e outros vírus. Assim, o objetivo geral deste projeto será caracterizar o papel da sinalização purinérgica em infecções virais e bacterianas graves e correlacionar estas alterações com a gravidade e desfecho das doenças. Para isto, será coletado aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave, com diagnóstico de infecção bacteriana ou viral, ou com choque séptico e, para o grupo controle, serão selecionados os participantes com quadro correspondente, porém sem diagnóstico de infecção pulmonar viral ou bacteriana. Análises de imunofenotipagem, mediadores purinérgicos, endotoxinas e citocinas serão avaliadas em ambos os fluídos biológicos.

Abstract:

In intensive care unit (ICU) patients with respiratory infection, one of the challenges is the differentiation between viral and bacterial pulmonary infection, in addition to the risk of progression to sepsis and septic shock that can occur both in bacterial infections and in those initiated by viral disease, such as COVID-19. COVID-19 is a complex disease characterized by changes in the compartments of innate and adaptive immunity, which affects not only the number of cells, but also their functionality. Recently, our group demonstrated that alterations in the CD39/CD73 axis of T lymphocytes, as well as a reduction in extracellular adenosine levels are associated with the severity of COVID-19, making it important to better characterize and study these alterations in other cells and tissues and in respiratory diseases. caused by bacteria and other viruses. So, the general objective of this project will be to characterize the role of purinergic signaling in severe viral and bacterial infections and to correlate these changes with the severity and outcome of

diseases. For this, tracheal aspirate will be collected from patients with severe COVID-19, diagnosed with bacterial or viral infection, or with septic shock and, for the control group, participants with a corresponding condition, but without a diagnosis of viral or pulmonary infection, will be selected. bacterial. Analysis of immunophenotyping, purinergic mediators, endotoxins and cytokines will be evaluated in both biological fluids.

Racional da proposta

Infecções bacterianas e virais

Um dos grandes desafios em infecções hospitalares está na diferenciação entre infecção pulmonar viral e bacteriana, onde um equívoco no diagnóstico pode ocasionar efeitos deletérios, utilização de antibióticos desnecessariamente ou postergando o tratamento correto (Watkins, 2022). A infecção viral pode manifestar-se com sintomas variados, tais como febre, tosse, falta de ar grave, esforço ventilatório, podendo evoluir para sepse e insuficiência respiratória aguda (Pagliano et al., 2021). Por outro lado, a infecção bacteriana do trato respiratório inferior possui sintomas clínicos de tosse, febre, secreção, dispneia, dor torácica, entre outros, justificando a ambiguidade dos sintomas e a necessidade de culturas da via aérea para a correta identificação do patógeno causador e métodos de tratamento (Staub et al., 2019).

Sabe-se que o tempo necessário para o diagnóstico de doença pulmonar secundária a infecções varia de 2 a 21 dias após admissão hospitalar e 4 a 18 dias após da admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Chong et al., 2021). As infecções bacterianas secundárias não dependem diretamente do vírus ou bactéria causadores da pneumonia inicial, mas parece estar diretamente ligadas ao tempo de estadia hospitalar (RUIZ-BASTIÁN et al., 2021), sendo o choque séptico uma grave complicação durante a permanência hospitalar. Segundo De Backer e colaboradores (2019) o choque séptico é caracterizado por uma resposta inflamatória exacerbada, associado a um desequilíbrio hemodinâmico circulatório e respiratório, com alto índice de mortalidade hospitalar (Gavelli et al., 2021).

Nesse contexto de infecção virais e bacterianas pulmonares, com possibilidade de evolução para quadros de sepse e/ou choque séptico, também se inclui a COVID-19, cuja gravidade está relacionada com uma desregulação da resposta imune, com intensa migração e ativação de leucócitos, aumento dos níveis sistêmicos de mediadores inflamatórios (Huang et al., 2020; Xu et al., 2020), e em especial linfopenia e exaustão de linfócitos T. Alterações no perfil de células T correlacionam-se com o aumento de infecções secundárias e risco de morte em pacientes criticamente doentes (Huang et al., 2020; Wang et al., 2020; Lopez-Collazo et al., 2020; Diao et al., 2020). Recentemente, nós demonstramos que pacientes com COVID-19 grave apresentam aumento de marcadores de translocação microbiana (CD14 solúvel e LPS), associado a uma forte ativação monocítica e níveis aumentados de TNF-alfa, IL-6, CCL-2 e CCL5 principalmente nas últimas 72 h de vida (Teixeira et al., 2021). Além disso, pacientes com quadro grave da doença e com maior carga viral apresentaram aumento de GM-CSF, TNF-alfa, PGE₂, e de produção de ROS mitocondrial e menor produção de IFN-tipo I que aqueles igualmente classificados com grave, mas com menor carga viral. Além disso, os monócitos CD14+ de pacientes com maior carga viral mostraram diminuição da expressão

de CD39 e HLA-DR e aumento de PD-1, ROS e disfunção mitocondrial em relação ao grupo com menor carga viral e controles não infectados (Romão et al., 2022).

Em trabalho recente, verificamos ainda que a estimulação de células sanguíneas totais de pacientes COVID-19 grave com LPS *in vitro* induziu menor produção de citocinas pró-inflamatórias em comparação com os controles ou COVID-19 leve. A estimulação *in vitro* com LPS reduziu a frequência de CD14+HLA-DR^{low} nos pacientes com doença grave, e induziu aumento marcante de TLR-4 e ativação NF-κB em ambos os monócitos CD14+HLA-DR^{high} e CD14+HLA-DR^{low} de controles saudáveis e COVID-19 leve em relação às células de pacientes com a forma grave da doença, demonstrando que a infecção por SARS-CoV-2 induziu tolerância de monócitos ao desafio com LPS *in vitro* (Dorneles et al., 2022). Desta forma, a COVID-19 grave assemelha-se a indução de estado de imunossupressão identificado na sepse, o que pode estar relacionado a um aumento na susceptibilidade a infecções secundárias.

O sistema purinérgico modula várias atividades imunológicas em praticamente todas as células do sistema imune (Burnstock & Boeynaems, 2014), com destaque para a ação pró-inflamatória do ATP extracelular e a ação imunoreguladora da adenosina, gerada principalmente por ação das ectonucleotidases CD39 e CD73. Nesse contexto, nós avaliamos a expressão das ectonucleosidases CD39 e CD73 em monócitos e LT e os níveis sistêmicos de ATP, ADP, AMP e adenosina em pacientes com COVID-19 de coortes oriundas da região metropolitana de Porto Alegre e de Goiânia-GO. No estudo com amostras de Porto Alegre, identificou-se uma relação entre a gravidade da COVID-19 e níveis sistêmicos diminuídos de adenosina e alterações na expressão de ectonucleotidases CD39 e CD73 em linfócitos T (Dorneles et al., 2022). Nós encontramos níveis plasmáticos reduzidos de ATP e adenosina em pacientes com COVID-19 (nas duas coortes), concomitante com frequências marcadamente alteradas de células T CD4+ e CD8+ T expressando CD39 e CD73. Além disso, amostras de plasma coletadas de pacientes graves foram capazes de diminuir a expressão de CD73 em LT CD4+ e CD8+ de um doador saudável e o tratamento de PBMC de pacientes com COVID grave com adenosina *in vitro* reduziu a ativação de NF-κB em células T e monócitos e também a produção de IL-1β e IL-17A (Dorneles et al., 2022). Recentemente, foi demonstrado aumento de P2X7 solúvel por ELISA em pacientes com COVID-19, sendo este aumento relacionado com a gravidade da doença. Neste estudo também foi demonstrado que a estimulação *in vitro* de PBMC com LPS e ATP induz liberação do receptor para P2X7 (García-Villalba et al., 2022).

Por outro lado, eventos imunossupressivos observados na seps e bacteriana estão relacionados à ativação de plasmablastos CD39^{high} e elevada produção de adenosina, sugerindo que a desregulação no metabolismo de nucleotídeos pode impactar diretamente no desfecho clínico de pacientes. O acúmulo de LPS e ATP extracelular no sangue periférico de pacientes com seps e supprime a ativação e a atividade mitocondrial de linfócitos T através da estimulação de receptores P2Y11 (Sueyoshi et al., 2019). No entanto, modelos *ex vivo* e *in vitro* utilizando co-estimulação de ligantes bacterianos demonstraram que a estimulação de ectonucleotidases através da incubação de nucleotídeos parece atenuar disfunções imunológicas induzidas na seps e (Nalos et al., 2008; Ren et al., 2014; Gross et al., 2020). Assim, o potencial imunomodulador de purinas durante a infecção do SARS-CoV-2 e seu impacto na imunossupressão e resposta a diferentes ligantes imunogênicos necessita de maior investigação.

Com base nesse conjunto de dados, nós propomos uma correlação entre a infecção pelo vírus SARS-Cov-2, indução de resposta pró-inflamatória exacerbada, com aumento de translocação bacteriana, alterações na sinalização purinérgica, levando aumento de ROS, disfunção mitocondrial, apoptose a exaustão de células imunes, além de menor responsividade a LPS e outros agonistas de TLR em pacientes graves que podem perdurar levando a imunossupressão e susceptibilidade a outros agentes infecciosos como vírus respiratórios e bactérias.

Assim, as hipóteses dessa proposta são as seguintes:

- i) A co-infecção de SARS-CoV-2 com bactérias presentes no trato respiratório está associada a um quadro clínico de maior gravidade, podendo levar a sepse e choque/séptico.
- ii) Os níveis circulantes de LPS e mediadores pró-inflamatórios como citocinas e mediadores lipídicos (PGE2) está associado ao *cytokine* storm, levando a disfunções metabólicas relacionadas à exaustão e também apoptose, linfopenia e monocitopenia em pacientes com doença pulmonar grave.
- iii) As alterações encontradas na expressão de CD39 e CD73 tanto em monócitos como em linfócitos T, juntamente com diminuição dos níveis de adenosina sistêmicos sugerem que a sinalização purinérgica tem participação importante na patogênese da COVID-19 sendo fundamental o estudo da expressão de purinoreceptores em leucócitos, bem como a modulação das funções imunológicas com antagonistas de receptores de ATP e agonistas de receptores de adenosina in vitro;
- iv) O aumento de produtos bacterianos circulantes nos pacientes com COVID grave pode ter relação com alterações na sinalização purinérgica, juntamente com alteração na responsividade de células da imunidade inata a diferentes agonistas de TLR, a exemplo do LPS nos pacientes graves pode estar associado à falha na regulação, contribuindo para a gravidade e imunossupressão tanto na COVID-19 como em outras doenças virais ou bacterianas que assumem um curso grave/sepse ou choque séptico;

Objetivo geral: Caracterizar o papel da sinalização purinérgica em infecções virais e bacterianas graves e correlacionar estas alterações com a gravidade e desfecho das doenças

Objetivos específicos: Em pacientes com infecções respiratórias graves causadas por vírus, incluindo casos de COVID-19, bactérias e sepse decorrente das infecções pretende-se:

- a) Avaliar os níveis pulmonares de lipopolissacarídeo (LPS), nucleotídeos extracelulares da adenina: adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e do nucleosídeo adenosina;
- b) A concentração de ácidos graxos de cadeia curta e aminoácidos no aspirado traqueal;
- c) Avaliar a expressão de ectonucleotidases CD39 e CD73 em células CD45+ do aspirado traqueal;
- d) A expressão de marcadores de co-estimulação e ativação (CD28, CD38, CD69, HLA-DR) e marcadores de exaustão (PD-1, KLRG-1) e produção de ROS em células CD45+ do aspirado traqueal;
- e) A produção de ROS, PGE2, CD14 solúvel, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-alfa no aspirado traqueal;
- f) Correlacionar alteração da mecânica pulmonar com a presença de quadro de sepse viral ou bacteriana e parâmetros imunológicos.

Metodologia

População e amostra: Trata-se de um projeto de pesquisa do tipo caso-controle formado por pacientes com infecção pulmonar grave internados em unidades de terapia intensiva (n=100) do Hospital Municipal de Canoas (Hospital Universitário) e do Hospital Nossa Senhora das Graças (Canoas-RS). Estes grupos serão pareados por idade e sexo. Os pacientes em UTI serão alocados nos seguintes grupos: 1) Diagnóstico de infecção pulmonar bacteriana (n=20), 2) Infecção pulmonar viral (n=20), 3) Pacientes com quadro de sepse/choque séptico (n=20) e 4) Grupo controle (n=20). Para o grupo controle serão selecionados os participantes com quadro correspondente, ou seja, durante internação em UTI e submetidos a possibilidade de estarem sob ventilação mecânica invasiva, porém sem diagnóstico de infecção pulmonar viral ou bacteriana.

Cálculo de amostra: O cálculo amostral apontou para um total de 80 sujeitos, considerando os grupos acima com base no estudo de Wauter e colaboradores (2021) considerando um poder de 90%, nível de significância de 5% e tamanho de efeito de 0.40 para diferenças nos níveis extracelulares de ATP no aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave em comparação a pacientes controles e/ou com infecção viral não-específica (Wauter et al., 2021).

Crítérios de inclusão: Pacientes com diagnóstico confirmado das condições acima e tratamento em unidade de terapia intensiva.

Crítérios de exclusão: Serão excluídos da amostra pacientes internados em UTIs e que não tiverem recomendação/prescrição para coleta de aspirado traqueal pela equipe de fisioterapia.

Coleta de dados de pacientes doenças pulmonares graves e internados em UTI: A escolha dos participantes elegíveis internados nas UTIs será realizada através do prontuário informatizado do paciente via intranet das instituições. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente ou familiar responsável, a coleta de dados e material biológico será realizada pela Fisioterapeuta Priscila Becker da Silva, CREFITO/RS 226074-F, graduada em fisioterapia em 2016 pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) e pós-graduada pela Residência Multiprofissional em Saúde do Adulto e Idoso, em 2019, também pela ULBRA. Possui 5 anos de experiência em âmbito hospitalar e Unidade de Terapia Intensiva. Inicialmente serão transcritos os sinais vitais dos pacientes, frequência cardíaca (FR), pressão arterial (PA), saturação periférica de oxigênio (SpO₂), e frequência respiratória (FR), bem como os parâmetros da ventilação mecânica (VM), sendo eles o modo ventilatório (PSV, PCV ou VCV), pressão inspiratória ou volume de ar corrente controlado (conforme modo ventilatório), pressão expiratória positiva final (PEEP), fração inspirada de oxigênio (FiO₂), frequência respiratória (FR), sendo ela programada ou espontânea, volume de ar corrente espontâneo (VAC) e volume minuto (VM). Também serão verificados a mecânica pulmonar dos pacientes, que consiste em complacência estática (ml/cmH₂O), pressão de pico (cmH₂O), pressão de platô (cmH₂O) e driving pressure (cmH₂O).

Coleta do aspirado traqueal (apenas de pacientes internados e com prescrição para o procedimento). A coleta desse material será feita pela fisioterapeuta através de sonda de aspiração nº 12; e frasco coletor de aspirado traqueal apenas de pacientes com prescrição médica para a coleta seguindo procedimentos de rotina da UTI. Ao finalizar a aspiração, o paciente retornará para a ventilação mecânica e a sonda e a luva estéril serão devidamente descartadas no lixo correspondente. O frasco coletor de aspiração será fechado

e etiquetado com identificação do paciente, data da coleta e especificação da via aérea coletada. Para pacientes ventilando espontaneamente, será adotada a mesma rotina de coleta, porém a aspiração será de vias aéreas superiores por via nasal. Quando a secreção apresentar consistência espessa poderá ser acrescido 1 ml de soro fisiológico 0,9% se houver necessidade para fluidificar a secreção e facilitar seu processamento para análise. A amostra de aspirado traqueal será encaminhada para análise no Lab de Imunologia da UFCSPA no prazo máximo de 4 horas após a coleta, mantendo-a sob refrigeração nesse intervalo de tempo, para processamento e análises cabíveis.

Obtenção de células do aspirado traqueal: Para obtenção de células do aspirado traqueal, o fluido será diluído em proporção 1:1 com 0.1 M de ditioneitol (ThermoFisher, EUA) e incubado por 15 min a 37°C. A solução então será centrifugada (750g, 4°C, 10 min) e as células serão utilizadas para citometria de fluxo. O sobrenadante será preservado em -20°C para avaliação de componentes do sistema purinérgico e citocinas.

Avaliação dos níveis de purinas da adenina e LPS no aspirado traqueal: Os níveis de LPS, ATP, ADP, AMP e adenosina serão quantificados através da técnica de cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) conforme descrito em Dorneles et al (2022).

Determinação de ácidos graxos de cadeia curta em plasma por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas: A quantificação simultânea dos ácidos graxos em plasma é realizada por LC-MS/MS. Uma alíquota de 50 µL de plasma e 20 µL de NaOH 2M são adicionados a tubos de plástico tipo eppendorf, seguida da adição de 175 µL de HCl 2M. A amostra é agitada em vórtex por 30 s, centrifugada durante 6 min a 12 000 g e 175 µL do sobrenadante é recolhido e transferido para um frasco de vidro. São adicionados 25 µL de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) para promover a derivatização dos ácidos graxos. O frasco é fechado e incubado por 30 minutos a 40 °C. Em seguida, a amostra é agitada em vórtex por 30 segundos e centrifugada durante 3 min a 12 000 g. Uma alíquota de 50 µL é transferida para um novo tubo eppendorf e 150 µL de acetonitrila são adicionados ao tubo. A amostra é agitada em vórtex por 30 segundos e centrifugada durante 3 min a 12 000 g. Em seguida, 100 µL são transferidos para um insert e vial e uma alíquota de 10 µL é injetada no equipamento de sistema analítico. Para a análise das amostras foi utilizado o sistema Nexera-i LC-2040C Plus acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de Massas: As amostras são preparadas em tubos de 1,5 mL, adicionando-se 50 µL de plasma, e 150 µL de acetonitrila para promover a precipitação de proteínas. Após agitação por 30 segundos as amostras são centrifugadas a 9000 g por 6 minutos. Em seguida, são coletados 100 µL do sobrenadante e adicionados em 100 µL de tampão acetato de amônio 50 mM. Uma alíquota de 3 µL é injetada no sistema analítico. Para a análise das amostras foi utilizado o sistema Nexera-i LC-2040C Plus acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Análise de imunofenotipagem e apoptose: As células obtidas do aspirado traqueal serão incubadas com anticorpos monoclonais específicos conforme descrito nos objetivos em um procedimento de marcação conjugado com fluorocromos específicos: anti-CD45, anti-CD28, anti-CD69, anti-CD38, anti-CD39, anti-

CD73, anti-HLA-DR, anti-KLRG1, anti-PD-1. 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 FACSCalibur BD.

Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio em células CD45+. A análise produção de espécies reativas de oxigênio será quantificada através do reagente MitoSox™ (MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, número de catálogo M36008, Invitrogen™, EUA) por citometria de fluxo com excitação/emissão em 510/580.

Quantificação de citocinas PGE2 e CD14 solúvel: As concentrações das citocinas: TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-17, TGF-beta e IFN-alfa, e também de CD14 solúvel e PGE2 serão mensuradas por ELISA seguindo as recomendações do fabricante dos kits (Teixeira et al., 2021, Romão et al., 2022).

Análise estatística: A normalidade dos dados será testada pelo teste de Kolgomorov-Smirnov e os dados serão apresentados através de média $\pm$ desvio padrão. Uma análise de variância de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. 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.

Considerações Éticas: Este projeto já teve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA. Todos os participantes irão autorizar sua inclusão na pesquisa ao aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I). Este projeto de pesquisa seguirá as Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a pesquisa em saúde, do Conselho Nacional em Saúde, segundo a Resolução 466/12. A instituição na qual o projeto será desenvolvido irá autorizar sua realização por meio do Termo de Anuência (ANEXO II).

Riscos e benefícios: O procedimento de aspiração de secreção traqueal faz parte do tratamento do paciente na UTI e será realizado pela equipe fisioterapeuta da UTI, onde o paciente é continuamente monitorizado e rapidamente atendido ao sinal de qualquer instabilidade hemodinâmica ou hipoxemia decorrente do procedimento. Com relação aos benefícios, a participação neste estudo permitirá o desenvolvimento de conhecimento que contribuirá para saúde pública, levando ao avanço do conhecimento e criação de estratégias visando o manejo das doenças pulmonares graves. Os participantes não receberão de forma direta nenhum benefício.

Orçamento

A infraestrutura e os equipamentos necessários para a realização do projeto estão disponíveis no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, na Unidade Bioanalítica e na Central Analítica da UFCSPA,

CONSUMO	Valor R\$
Materiais plásticos descartáveis diversos e EPIs: placas de cultura, tubos eppendorf, tubos de citometria, luvas cirúrgicas, ponteiros, placas de ELISA	2.000,00
Reagentes diversos:	3.000,00

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF), 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), Bovine Serum Albumin, Hemotest Spec, Kit para detecção de apoptose Annexin V Ebioscience 300 test, Soro bovino fetal, Hepes 100 g, Lipopolysaccharides from <i>Escherichia coli</i> 026:B6, MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator, 7-AAD Viability staining solution, MitoStatus TMRE	
Kits de ELISA (Citocinas, prostaglandinas e sCD14): kits para 96 amostras Peprtech	10.000,00
Anticorpos para citometria (diversos conforme metodologia)	20.000,00
Reagentes para quantificação de purinas da adenina	2.000,00
Materiais para coleta do aspirado traqueal: luva látex, luva plástica estéril, extensor de aspiração, sonda de aspiração nº 12, coletor de aspirado traqueal	1.000,00
TOTAL	38.000,00

Financiamentos

Nos últimos anos, pesquisadores do Lab de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA obtiveram financiamentos de fontes internas (edital PROPPG 01/2019, PROPPG 07/2020 (COVID-19), PROPPG 04/2021 (COVID-19), PROPPG 10/2022 (COVID-19)) e externas (Pesquisador Gaúcho PqG da FAPERGS (05/2019)). Assim, a grande maioria dos reagentes e kits para realização deste projeto estão disponíveis no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, sob responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão.

Cronograma

ETAPAS	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	4º trimestre
Recrutamento e coleta de amostras biológicas	x	x	x	
Coletas de dados clínicos e laboratoriais	x	x	x	
Avaliação dos níveis de purinas da adenina e LPS	x	x	x	
Avaliação dos aminoácidos e ac. graxos	x	x	x	
Quantificação de citocinas PGE2 e CD14 solúvel, ROS		x	x	
<u>Imunofenotipagem</u>		x	x	x
<u>Análise estatística</u>	x	x	x	x
<u>Preparo de artigos</u>			x	x

*Projeto já aprovado pelo CEP da UFCSPA

Resultados esperados

- Geração de novos conhecimentos que irão auxiliar na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na imunopatogenia das infecções pulmonares bacterianas e virais, em especial com relação a participação purinérgica e marcadores imunológicos.
- Formação de recursos humanos: Profissionais da área da saúde e de Pós-Graduação estarão envolvidos no desenvolvimento, discussão dos resultados desta pesquisa, fortalecendo a relação Universidade e com o SUS.
- Produção de artigos científicos a serem publicados em revista indexada e internacional de alto impacto;

d) Impacto social: geração de conhecimentos que irão auxiliar no entendimento da patogenia das infecções pulmonares graves.

Originalidade, relevância e impacto do projeto para o desenvolvimento científico, tecnológico ou social

Esse projeto tem elevado grau de originalidade visto que há poucos estudos sobre a avaliação do sistema purinérgico em infecções pulmonares (comparação entre infecção bacteriana e viral) e sobre a rede de interligações que acreditamos ser mediada pelo sistema purinérgico ao modular uma série de funções celulares e imunológicas. Assim, a realização deste estudo irá contribuir para:

- Geração de novos conhecimentos no campo da modulação purinérgica em infecções pulmonares
- Formação de recursos humanos altamente qualificados em nível de graduação e pós-graduação. Na nossa equipe de trabalho terá uma fisioterapeuta que desempenha atividades nos hospitais parceiros, de modo que a pesquisa possibilitará a execução de parceria entre Hospital e a Universidade.
- Publicações de artigos: Espera-se a produção de no mínimo 2 artigos que 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.
- Desenvolvimento de pesquisa com aderência a ciência básica e aplicada e também de Tecnologias para Qualidade de Vida conforme PORTARIA MCTI Nº 5.109, DE 16 DE AGOSTO DE 2021.

Referências

- Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signalling and immune cells. Purinergic Signal. 2014 Dec;10(4):529-64. doi: 10.1007/s11302-014-9427-2.
- Chong WH et al., State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. Infection. 2021 Aug 49. doi: 10.1007/s15010-021-01602-z.
- De Backer D et al., Challenges in the management of septic shock: a narrative review. Intensive Care Med. 2019 Apr 45. doi.org/10.1007/s00134-019-05544-x.
- Diao B et al., Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Front Immunol. 2020 May 1;11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
- Dorneles GP et al., Alterations in CD39/CD73 axis of T cells associated with COVID-19 severity. J Cell Physiol. 2022 Jun 27. doi: 10.1002/jcp.30805.
- Dorneles GP et al., Endotoxin tolerance and low activation of TLR-4/NF-κB axis in monocytes of COVID-19 patients. Journal of Molecular Medicine, Preprint disponível em https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4079594).
- Dorneles GP et al., Immunoregulation induced by autologous serum collected after acute exercise in obese men: a randomized cross-over trial. Sci Rep. 2020 Dec 10;10(1):21735. doi: 10.1038/s41598-020-78750-z.

- García-Villalba et al., Soluble P2X7 Receptor Is Elevated in the Plasma of COVID-19 Patients and Correlates With Disease Severity. *Front Immunol.* 2022 May 18;13:894470. doi: 10.3389/fimmu.2022.894470.
- Gavelli F et al., Management of sepsis and septic shock in the emergency department. *Intern Emerg Med.* 2021 Sep 16. doi: 10.1007/s11739-021-02735-7.
- Gross CM et al., Adenosine and ATPγS protect against bacterial pneumonia-induced acute lung injury. *Sci Rep.* 2020 Oct 22;10(1):18078. doi: 10.1038/s41598-020-75224-0.
- Huang C et al., Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020;395:497–506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5).
- Lopez-Colazzo et al. Immune response and COVID-19: A mirror image of Sepsis. *Int J Biol Sci.* 2020 16 (14). doi:10.7150/ijbs.48400.
- Nalos M et al., "Host tissue damage" signal ATP impairs IL-12 and IFNγ secretion in LPS stimulated whole human blood. *Intensive Care Med.* 2008 Oct;34(10):1891-7. doi: 10.1007/s00134-008-1156-y.
- Pagliano P et al., Characteristics of viral pneumonia in the COVID19 era: an update. *Infection.* 2021 Aug 49. doi: 10.1007/s15010-021-01603-y.
- Ren H et al., Toll-like receptor-triggered calcium mobilization protects mice against bacterial infection through extracellular ATP release. *Infect Immun.* 2014 Dec;82(12):5076-85. doi: 10.1128/IAI.02546-14.
- Romão PR, et al., Viral load is associated with mitochondrial dysfunction and altered monocyte phenotype in acute severe SARS-CoV-2 infection. *Int Immunopharmacol.* 2022 Jul;108:108697. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108697.
- Ruiz-Bastián et al., Bacterial co-infections in COVID-19 pneumonia in a tertiary care hospital: Surfing the first wave. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021 Nov 101. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115477.
- Staub LJ et al., Lung Ultrasound for the Emergency Diagnosis of Pneumonia, Acute Heart Failure, and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Asthma in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Emerg Med.* 2019 Jan 56. doi: 10.1016/j.jemermed.2018.09.009.
- Sueyoshi K, et al., Lipopolysaccharide suppresses T cells by generating extracellular ATP that impairs their mitochondrial function via P2Y11 receptors. *J Biol Chem.* 2019 Apr 19;294(16):6283-6293. doi: 10.1074/jbc.RA118.007188.
- Teixeira PC, et al., Increased LPS levels coexist with systemic inflammation and result in monocyte activation in severe COVID-19 patients. *Int Immunopharmacol.* 2021 Nov;100:108125. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108125.
- Wang D, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061–1069.
- Watkins RR, Using Precision Medicine for the Diagnosis and Treatment of Viral Pneumonia. *Adv Ther.* 2022 Jul 39. doi: 10.1007/s12325-022-02180-8.
- Wauter E, et al. Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. *Cell Research.* 31, 272-290, 2021.

- Xu Z, et al. Pathological findings of COVID19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020: 8:420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X).

ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre Coronavírus. A pesquisa busca avaliar as ações biológicas durante infecções bacterianas e virais. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre o objetivo da pesquisa, **caso você aceite em participar, deverá assinar este documento, ficando com uma via do mesmo devidamente assinada pelo pesquisador responsável.**

Esclareço que **se você decidir não participar do estudo você não será prejudicado no seu atendimento (caso esteja em acompanhamento médico).** Se decidir participar, você não receberá nenhuma compensação financeira, nem haverá custos relativos à sua participação na pesquisa, mas irá ajudar para que os pesquisadores possam obter avanços no conhecimento desta doença. A todo o momento uma equipe especializada e treinada poderá ser consultada para fornecer informações referentes à pesquisa. Todas as despesas relacionadas ao transporte/deslocamento são de responsabilidade da equipe de pesquisadores responsáveis pelo projeto. Se aceitar participar, suas dúvidas poderão ser esclarecidas diretamente pelo seu médico ou pelo pesquisador responsável Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão, via e-mail (pedror@ufcspa.edu.br) ou telefones: (51) 3303-8746, (51) 98621-3105 (pode ligar a cobrar, WhatsApp). Para tirar dúvidas sobre seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, situado na Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre-RS, telefone do CEP: 51 3303-8804.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa **“Caracterização do envolvimento do sistema purinérgico e dinâmica de linfócitos T residentes de memória na imunopatogenia de doenças virais e bacterianas”** será realizada por pesquisadores da Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre e no Hospital Municipal de Canoas (Hospital Universitário).

O objetivo da pesquisa é caracterizar o papel da sinalização purinérgica (ações biológicas e imunológicas) em infecções virais e bacterianas graves e correlacionar estas alterações com a gravidade e desfecho das doenças e em pacientes com infecções respiratórias graves causadas por vírus e bactérias, incluindo casos de COVID-19 e infecção generalizada (sepse) decorrente das infecções pretende-se avaliar células coletadas do sangue e secreção pulmonar. Através desse estudo buscamos também gerar novos conhecimentos que irão auxiliar no esclarecimento do funcionamento molecular, envolvidos na imunidade das infecções pulmonares bacterianas e virais, mesmo após o quadro de pós-COVID-19, auxiliar na formação de profissionais da área da saúde e contribuição ao SUS, produzir pesquisas e publicação de artigos, oferecer conhecimento que auxiliem no tratamento de doenças pulmonares graves.

Para realizar a pesquisa, será necessária a contribuição de praticantes, homens e mulher, acima de 18 anos que residam na região metropolitana para coleta de amostra de sangue.

Também serão analisados secreção pulmonar e consultados dados de exames de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com diagnóstico de:

- Infecção pulmonar bacteriana;
- Infecção pulmonar viral;
- COVID positivo;
- Pacientes com quadro de sepse (infecção generalizada).

Se você aceitar em participar do estudo, você está autorizando a coleta do seu sangue no caso de participantes não internados no hospital e, nos casos dos participantes em UTI, a coleta de secreção pulmonar e visualização dos dados da doença e exames no prontuário. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados e os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e análise do material.

Caso sua amostra de sangue colhida não seja completamente utilizada nos experimentos desse projeto, você deve informar se autoriza que o material que sobrou poderá ser armazenado no laboratório do pesquisador responsável na UFCSPA (Pedro Roosevelt Torres Romão) para ser utilizado em projetos futuros (sobre novos marcadores ou com novas metodologias), devidamente encaminhados ao Comitê de Ética em Pesquisa. Se você permitir, esteja certo de que os pesquisadores irão garantir todos os aspectos éticos, em especial, o sigilo e confidencialidade da sua identidade e dos resultados individuais obtidos no projeto. Os dados serão divulgados de forma global sem identificação dos pacientes.

Autorização para que o restante da **minha amostra de sangue, secreção pulmonar** sejam guardadas pelo pesquisador para uso em projetos futuros.

(☐) Autorizo (☐) Não autorizo

A participação na pesquisa envolve:

Para participantes que não estão internados no hospital, logo após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), será preenchida a ficha de dados cadastrais para o projeto onde constam dados pessoais, de doenças anteriores e uso de medicamentos. Logo após serão coletados 8 mL de sangue venoso através de da veia na parte anterior do braço. O sangue dos participantes será coletado na UFCSPA por profissional habilitado e enviado para o laboratório da UFCSPA pelos próprios pesquisadores do projeto. serão incluídos participantes que não apresentem sintomas de COVID19, infecção aguda viral ou bacteriana, alergias crônicas e/ou doenças ativas.

No caso de pacientes internados no Hospital Municipal de Canoas, a escolha dos participantes ocorrerá através do prontuário informatizado. Após assinatura de TCLE pelo paciente ou familiar responsável, serão verificados os sinais vitais do participante (frequência cardíaca, pressão arterial, saturação de oxigênio e frequência respiratória) e os valores do ventilador mecânico, quando for o caso. Através do sistema serão coletadas outras informações para a pesquisa, como o exame de sangue, doenças e dados pessoais.

Conforme prescrição médica, a coleta da secreção pulmonar será feita pela fisioterapeuta, que após colocar avental, luva, máscara e óculos de proteção, irá introduzir a sonda de aspiração ligada ao vácuo na via aérea (local pelo qual o participante está respirando: nasal, tubo orotraqueal ou traqueostomia) até ocorrer o estímulo de tosse ou resistência no trajeto e depois irá retirar a sonda aspirando secreção pulmonar durante esse tempo que serão, no máximo, 15 segundos durante o procedimento. Ao final, o participante segue sob os cuidados da equipe da UTI. A amostra de secreção pulmonar será encaminhada para análise no Laboratório de Imunologia da UFCSPA no prazo máximo de 4 horas após a coleta, mantendo-a sob refrigeração nesse intervalo de tempo.

Desconfortos e riscos potenciais: O risco consiste em potencial desconforto na coleta de sangue, dor no local da picada, formação de hematomas (manchas roxas) no local da coleta e tonturas, provenientes da punção venosa, que serão acompanhados pela equipe de coleta, conforme procedimentos de rotina. Havendo estas reações adversas, o participante receberá todos os cuidados necessários dos pesquisadores e equipe de saúde deste projeto. Para o grupo de pacientes internados, tanto a coleta de sangue como o procedimento de aspiração de secreção traqueal fazem parte do tratamento do paciente na UTI e será realizado pela equipe

fisioterapeuta da UTI, onde o paciente é continuamente monitorizado e rapidamente atendido ao sinal de qualquer alteração da frequência cardíaca, pressão arterial ou queda de oxigênio durante o procedimento.

Benefícios que poderão ser obtidos: A participação neste estudo permitirá o desenvolvimento de conhecimento que contribuirá para saúde pública, levando ao avanço do conhecimento e criação de estratégias com objetivo de melhorar o manejo das doenças pulmonares graves. Os participantes não receberão de forma direta nenhum benefício.

Descontinuação do Estudo: Você poderá deixar de participar deste estudo a qualquer tempo, sem que haja prejuízo ao seu atendimento hospitalar, bem como o pesquisador poderá retirá-lo do estudo, se julgar oportuno (tendo você o direito de ser informado quanto ao motivo). Além disso, o pesquisador e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa poderão decidir pelo término do estudo, caso seja necessário.

Esclarecimentos dados sobre garantias do sujeito da pesquisa:

1. Você terá a garantia, a qualquer tempo de que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida;
2. Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação a qualquer tempo. A participação é voluntária e a recusa em participar não envolverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Recusa ou descontinuação não irá de nenhuma forma colocar em risco seu direito de receber tratamento agora ou no futuro;
3. Seu médico e os demais investigadores desse estudo tratarão sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Você terá garantias de sigilo de sua participação. Seus registros permanecerão confidenciais;
4. Os investigadores e a Comissão de Ética podem pedir para rever seus registros sem que os nomes de participantes ou materiais identificando participantes sejam identificáveis e estes, somente serão liberados sem permissão escrita se exigido por lei;
5. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma via deste consentimento informado será mantida com o pesquisador responsável e outra será dada a você;
6. Todos os procedimentos referentes à sua participação neste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica não relacionada com este estudo será de sua responsabilidade;
7. Caso você tenha algum desconforto emocional e/ou constrangimento durante a coleta de material biológico você tem liberdade para se recusar a participar da coleta ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação no estudo;
8. Você terá direito de pleitear indenização (reparação a danos imediatos ou futuros), garantida em lei, decorrentes da sua participação na pesquisa;
9. Armazenamento e uso de material biológico coletado e dados obtidos exclusivamente para os fins previstos no protocolo da pesquisa (Resolução CNS 347/05).

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____

RG/CPF/ _____ abaixo assinado, concordo em participar do estudo “**Caracterização do envolvimento do sistema purinérgico e dinâmica de linfócitos T residentes de memória na imunopatogenia de doenças virais e bacterianas**” como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Nome do sujeito: _____

Assinatura do sujeito: _____

ou do responsável pelo paciente (Considerando o risco de contato com canetas), caso haja acompanhante.

Responsável pelo paciente: Nome: _____

Grau de Parentesco: _____ Assinatura: _____ Identidade N°: _____
Data: ____/____/____ Hora: ____: ____

Nome do Pesquisador Responsável: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Se você tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa e seus direitos enquanto participante, entre em contato com:

Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Pesquisador

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- Porto Alegre-RS.

Telefone: (51)3303-8746 / 3303-8908.

ANEXO II. TERMO DE ANUÊNCIA

TERMO DE ANUÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO SETOR OU INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA

Título do projeto da pesquisa

**Caracterização do envolvimento do sistema purinérgico e dinâmica de
linfócitos T residentes de memória na imunopatogenia de doenças
virais e bacterianas**

Eu, En^h Carla Chaves Pereira, coordenadora da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Municipal de Canoas (Hospital Universitário), tenho ciência do protocolo/projeto de pesquisa acima citado, desenvolvido por Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão, orientador do PPG em Ciências da Saúde e PPG em Biociências da UFCSPA, e fisioterapeuta Priscila Becker da Silva, candidata ao mestrado no PPG Ciências da Saúde, vinculada ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, dos objetivos e metodologia a ser utilizada, concordando com a realização da pesquisa neste local.

Data: 28/07/2022

CARLA CHAVES PEREIRA
Coordenadora UTI Adulto
HU - Hospital Universitario Canoas
Coren/RS 125029



Assinatura do responsável pelo setor/instituição

Carimbo

Projeto de Pesquisa: Avaliação do impacto da ativação imune materna pela obesidade e administração de Poli (I:C) e LPS durante a gestação

1.

Equipe:

Profa. Renata Padilha Guedes – Coordenadora, UFCSPA

Profa. Márcia Giovenardi – Colaboradora, UFCSPA

Prof. Victorio Bambini Junior – Colaborador, Lancaster University

Yasmin Meireles Bitencourt - Aluna de mestrado PPG Ciências da Saúde, UFCSPA

Fernanda Rodrigues - Aluna de doutorado PPG Biociências, UFCSPA

Jeferson Jantsch - Aluno de doutorado PPG Biociências, UFCSPA

Victor Silva Dias - Aluno do curso de Biomedicina, UFCSPA

Resumo

Introdução: O transtorno do espectro do autismo (TEA) é um difícil e complexo transtorno do neurodesenvolvimento que apresenta, dentre suas características, alterações de interação social, interesses restritos e comportamentos repetitivos e excessivos para a idade e ambiente social do indivíduo. A etiologia do TEA ainda é incerta, porém, fatores genéticos e ambientais são descritos. A infecção materna durante a gravidez pode ser classificada como um desses agressores externos responsáveis pelo surgimento de transtornos psiquiátricos, como o autismo. Está bem consolidado na literatura que a ativação imune materna (AIM) em roedores provoca comportamentos semelhantes ao autismo e à esquizofrenia na prole. Outro fator que vem ganhando atenção nos últimos anos, é a obesidade materna, devido ao estado pró-inflamatório provocado por esta

condição. Contudo, não é conhecido se a obesidade materna tem potencial de predispor aos distúrbios de neurodesenvolvimento como o autismo.

Objetivo: Este projeto propõe comparar as consequências da AIM sobre comportamentos do tipo autista em ratos Wistar.

Metodologia: A AIM será induzida por administração de ácido polinossínico:policitidílico (poli I:C) na dose de 20 mg/kg (grupo poli I:C) e de lipopolissacarídeo (LPS) na dose de 50 ug/kg (grupo LPS) no 12º dia de gestação em ratas Wistar. Além desses dois grupos, haverá ainda um grupo controle de ratas prenhas que receberão administração intraperitoneal de salina. Poli I:C e LPS são tratamentos amplamente usados para a indução de AIM, e já demonstraram causar aumento da estereotipia, comunicação alterada e interação social reduzida. A prole será avaliada no período juvenil (de 21 a 45 dias de vida) e na vida adulta (a partir de 60 dias). Os animais juvenis serão submetidos aos seguintes testes comportamentais: Campo aberto, preferência e memória social e labirinto em cruz elevado. Os animais adultos realizarão os seguintes testes: labirinto em cruz elevado, campo aberto, reconhecimento social e preferência à sacarose. Após a realização dos testes, os animais serão eutanasiados e o sangue e o encéfalo serão coletados e armazenados para posterior dosagem de citocinas inflamatórias (por ELISA), LPS (por LC-MS/MS) e de neurotransmissores (por LC-MS/MS). Os resultados serão analisados por ANOVA de uma via.

Resultados preliminares: Em um estudo prévio foi demonstrado que a obesidade materna induzida por CAF provocou alterações comportamentais na prole, aumentando o comportamento do tipo ansioso e causando déficits de interação social. Os resultados do presente estudo serão comparados com o estudo prévio realizado com a prole das ratas obesas para comparação dos modelos de AIM com o modelo de obesidade gestacional.

Impactos esperados: O presente projeto terá grande relevância na geração de dados sobre o impacto da obesidade materna sobre o neurodesenvolvimento da prole. Ainda, a comparação dos resultados de duas intervenções que conhecidamente geram AIM e alterações comportamentais na prole será de

grande importância para a elucidação da pergunta de pesquisa na qual está embasado este projeto, ou seja, se a obesidade materna pode gerar AIM assim como é descrito em relação à presença de vírus ou bactérias no período pré-natal. Esses dados terão potencial de publicação em revista científica de alto índice de impacto, geração de recursos humanos (mestrado e alunos de iniciação científica) e divulgação dos dados em eventos científicos bem como em mídias voltadas para o público geral.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do espectro autista

Dados publicados no ano de 2020 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos, estimam que 1 em cada 36 crianças são diagnosticadas com transtorno do espectro autista (TEA); em 2018 essa taxa era de 1 em 44 crianças. Além disso, a proporção entre homens e mulheres acometidos pelo transtorno é de 4:1 (CDC, 2018). Diante dessa alta prevalência, é possível entender a necessidade de mais estudos buscando compreender a etiologia desse transtorno para assim, desenvolver possibilidades terapêuticas.

O autismo é um transtorno do neurodesenvolvimento que possui aspectos que prejudicam a comunicação e interação social, além de ser caracterizado pela presença de comportamentos estereotipados (MALKOVA et al., 2012). A causa deste e de outros transtornos psiquiátricos que têm origem no neurodesenvolvimento, ainda permanece desconhecida (ARRODE-BRUSÉS; BRUSÉS, 2012). Entretanto, sabe-se que defeitos genéticos e fatores ambientais podem interferir na formação do sistema nervoso central, resultando em alterações cognitivas, sensoriais e emocionais (MILLER et al., 2005; PATTERSON, 2009; WALSH; MORROW; RUBENSTEIN, 2008).

A infecção materna durante o período gestacional vem sendo apontada como um grande risco para o desenvolvimento do autismo (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020). As alterações imunológicas na mãe durante a gravidez podem impactar o desenvolvimento do embrião, e sendo assim, a exposição a quaisquer

patógenos durante a gestação são fatores de risco para o TEA, gerando alterações neuroimunes em humanos e que também são observadas em modelos animais do transtorno (DECKMANN et al., 2019).

A desregulação imunológica aparente no autismo ainda não está clara, mas é evidente que a infecção materna pode alterar o estado imunológico do cérebro fetal já que os níveis de citocinas são alterados e esta característica é comum em indivíduos autistas (DECKMANN et al., 2019; PATTERSON, 2009). Consequentemente, a elevação dos níveis de citocinas pode alterar significativamente a fisiologia cerebral e do comportamento, havendo uma ligação entre a disfunção imunológica e deficiências comportamentais.

Por exemplo, o aumento da interleucina 1 β (IL-1 β), que ocorre em indivíduos autistas, está associado com estereotipia. Da mesma maneira, em um modelo pré-clínico de autismo, foi observada elevação nos níveis de IL-6 no tecido cerebral, no soro e em células mononucleares dos animais; esse achado foi associado ao aumento da hiperatividade, estereotipia e letargia (DECKMANN et al., 2019). Além disso, há dados de pacientes com TEA mostrando alterações em diferentes citocinas tanto no plasma quanto no cérebro e além disso, embora estes pacientes possuam níveis de imunoglobulinas IgM e IgG reduzidos, também apresentam níveis aumentados de anticorpos contra várias proteínas expressas no tecido nervoso, como por exemplo os receptores de serotonina (GOTTFRIED et al., 2015).

Um estudo dinamarquês com mais de dez mil casos de autismo, mostrou uma associação muito robusta entre o TEA e a infecção viral materna no primeiro trimestre de gestação, além de uma associação significativa entre o autismo e a infecção bacteriana na mãe, no segundo trimestre (ATLADÓTTIR et al., 2010). Esses resultados só reforçam a conexão entre a infecção materna como um fator epigenético que tende a gerar alterações neuroimunes que corroboram para o desenvolvimento do autismo.

1.2 Obesidade materna e autismo

A hipertensão, diabetes e várias outras doenças decorrentes do sobrepeso, não são os únicos riscos à saúde que a obesidade durante a gestação pode ocasionar. Sendo o autismo um transtorno multifatorial, a obesidade materna tem sido associada ao aumento do risco de TEA na prole por meio de diversos mecanismos, dentre eles, a hiperglicemia que tem potencial de impactar negativamente o neurodesenvolvimento normal do feto (LI et al., 2015).

A obesidade materna também pode causar neuroinflamação fetal (REYNOLDS et al., 2014). Assim, uma dieta rica em gordura pode afetar o neurodesenvolvimento da prole por meio de processos como a neuroinflamação, aumento do estresse oxidativo, resistência à insulina e outros distúrbios que são ainda maiores quando há presença de diabetes gestacional (BÖLTE; GIRDLER; MARSCHIK, 2019).

No estudo de Li e colaboradores (2016) com mais de 2 mil crianças, incluindo 102 casos de autismo, foi descoberto que a combinação de obesidade e diabetes estava associada com risco significativamente aumentado de TEA. Esses resultados contribuem para as evidências que sugerem o aparecimento do autismo relacionado a distúrbios imunológicos e metabólicos, já que a obesidade está associada ao aumento do estado pró-inflamatório nas mulheres grávidas (LI et al., 2016; EDLOW, 2017).

1.3 Ácido polinossínico:policitidílico (poli I:C)

A infecção materna durante a gravidez, tem sido considerada um fator de risco epigenético muito grande para o autismo e a esquizofrenia (ARRODE-BRUSÉS; BRUSÉS, 2012). Evidências epidemiológicas seguidas de estudos com modelos animais, mostraram haver alterações comportamentais, neuroquímicas e neurofisiológicas na prole devido à ativação imune materna (AIM) no período pré-natal, podendo esses efeitos serem investigados pelo uso do ácido polinossínico:policitidílico (poli I:C) em roedores (VIGLI et al., 2020).

O poli (I:C) é um RNA sintético de fita dupla que vem sendo utilizado, nos últimos 15 anos, para despertar respostas imunes semelhantes a vírus (POTASIEWICZ et al., 2020). Ainda, seu uso tem sido empregado em modelos pré-clínicos de TEA e esquizofrenia. No sistema imunológico, o poli (I:C) liga-se

ao receptor Toll do tipo 3 (TLR3), desencadeando a sinalização pró-inflamatória com a liberação de diversas citocinas (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020).

Nesses estudos com o uso de poli (I:C) durante a gestação, foram demonstrados prejuízos no contato social dos filhotes, principalmente quando a exposição ocorreu nos dias 9 e 12 de gestação. Aspectos de comunicação, como as vocalizações ultrassônicas, e comportamentos do tipo ansioso também apareceram alterados (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020). Já no estudo de Vigli e colaboradores (2020), houve a conclusão de que a AIM pré-natal utilizando unicamente poli (I:C) pode ser variável, principalmente diante dos parâmetros sociais, pois os efeitos mais facilmente detectados foram os comportamentos repetitivos motores e déficits sensoriais. Por essa razão, os autores recomendam maior cautela em considerar um único desafio imune pré-natal de poli (I:C) em camundongos como determinante de déficits sociais na prole (VIGLI et al., 2020).

Após a sua utilização em modelos pré-clínicos de roedores, poli (I:C) mostra face considerável e validade preditiva, mostrando comportamento e déficits moleculares ligados a distúrbios como TEA e ESQ, além de responder de maneira semelhante a tratamentos conhecidos em humanos. Seus efeitos em relação à inflamação o vinculam com vários outros fatores de risco para o desenvolvimento neurológico, como estresse no início da vida, o que significa que pode ajudar a descobrir mecanismos fisiopatológicos subjacentes comuns de distúrbios como TEA e ESQ (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020).

Embora uma infinidade de estudos tenha sido realizada com poli (I:C), a tentativa de resumir os resultados muitas vezes se mostra difícil, pois diferenças metodológicas na dose, comprimento da cadeia poli (I:C), via de administração, tempo gestacional e escolha de espécies podem produzir resultados críticos (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020).

No estudo de Vigli et al. (2020), houve a conclusão de que o tratamento AIM pré-natal utilizando unicamente poli (I:C) pode ser variável, principalmente diante dos parâmetros sociais, pois os efeitos mais facilmente detectados foram os comportamentos repetitivos motores e déficits sensoriais. Por essa razão, os autores recomendam maior cautela em considerar um único desafio imune pré-

natal de poli (I:C) em camundongos como determinante de déficits sociais na prole (VIGLI et al., 2020).

1.4 Lipopolissacarídeo (LPS)

A administração de lipopolissacarídeo (LPS) também é amplamente utilizada para mimetizar uma infecção bacteriana, a qual ativa o receptor TLR4, e se destaca como outro método de AIM (PATTERSON, 2009). Além disso, a administração de LPS causa efeitos como alterações na temperatura corporal, na função neuroendócrina e comportamental (BORRELL et al., 2002). Foi demonstrado que os filhotes de ratas Wistar tratadas com LPS emitiram menos vocalizações do que seus controles (POTASIEWICZ et al., 2020). Ainda, houve elevação nos níveis circulantes IL-2 e IL-6 na prole adulta de ratas que receberam LPS durante a gestação, alteração esta que também é evidenciada em pacientes com esquizofrenia (BORRELL et al., 2002).

Um aspecto em comum com a AIM causada pelo poli (I:C), é a presença de neuroinflamação nos filhos das mães tratadas com LPS e além disso, injeções únicas ou duplas de LPS podem causar maior ansiedade, déficits na interação social e no aprendizado (PATTERSON, 2009). Além das deficiências comportamentais, os modelos de exposição pré-natal ao LPS também já mostraram causar alterações nos níveis de neurotransmissores (KIRSTEN et al., 2013). Entretanto, em comparação com o uso de poli (I:C), o LPS é mais comumente utilizado em ratos do que em camundongos e o tempo e a frequência das injeções de LPS variam muito. Por exemplo, as injeções de LPS foram realizadas já no dia 7 de gestação e até o último dia de gravidez. Além disso, numerosos estudos usando LPS realizam múltiplas injeções em dias consecutivos ou alternados, e alguns até fazem injeções durante toda a gravidez. Isso contrasta com poli (I:C) AIM, onde a maioria dos estudos realiza uma única ativação imune aguda (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

As repercussões da obesidade materna sobre o sistema nervoso central são extensas, porém o impacto da obesidade materna sobre o neurodesenvolvimento da prole ainda são desconhecidos. Considerando que os índices de obesidade materna são crescentes nas últimas décadas, e o número de crianças diagnosticadas com TEA também são, a realização deste estudo será relevante para a busca de evidências da relação entre a obesidade como um fator predisponente ao autismo em um modelo pré-clínico.

3. HIPÓTESE:

Sabe-se que a ativação imune materna que é causada pelo contato da mãe com vírus ou bactérias durante o período gestacional predispõe ao desenvolvimento de alterações comportamentais associadas a autismo e esquizofrenia. A obesidade materna, por sua vez, gera um quadro inflamatório que também afeta o neurodesenvolvimento, podendo, desta forma, ser considerada como um fator de ativação imune materna, assim como vírus e bactérias.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ativação imune materna sobre comportamentos do tipo autista e esquizofrênico da prole de ratas Wistar.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da administração de Poli (I:C) e LPS durante o período gestacional sobre comportamento da prole;
- Comparar as respostas comportamentais obtidas com aquelas encontradas na prole de mães obesas;
- Avaliar o perfil inflamatório dos animais por meio de dosagem de citocinas inflamatórias no plasma e no tecido nervoso;
- Avaliar os níveis de LPS no plasma e no tecido nervoso;

- Avaliar sistemas de neurotransmissores no córtex cerebral, hipotálamo e hipocampo.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais, descarte de resíduos e considerações éticas

Serão utilizados ratos Wistar machos (N=120) e fêmeas (N=132), mantidos em caixas de acrílico no biotério da UFCSPA. A sala onde os animais permanecerão possui controle de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (as luzes permanecerão acesas das 7h às 19h).

Após a eutanásia, as carcaças dos animais serão acondicionadas em sacos brancos para descarte de resíduos biológicos e entregues ao Biotério para procedimento de eliminação por empresa especializada. Serão tomados todos os cuidados para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento. Todos os procedimentos experimentais propostos estão de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 08.10.2008) segundo as orientações do CEUA da UFCSPA. Este trabalho será submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais e somente será iniciado após sua aprovação.

5.2 Administração de Poli (I:C) e LPS

Os compostos utilizados para gerar ativação imune nas mães, serão administrados no dia 12 de gestação por via intraperitoneal, em uma única dose, sendo essas: 20 mg/kg de poli (I:C) e 50 ug/kg de LPS. Em diversos estudos, essas condições de administração mostraram gerar efeitos de comunicação alterada, interação reduzida e aumento de estereotipia na prole (ARRODE-BRUSÉS; BRUSÉS, 2012; LOMBARDO et al., 2018; O'LOUGHLIN et al., 2017; VIGLI et al., 2020).

5.3 Estimativa do *n* amostral

O projeto em questão propõe o uso de diferentes metodologias. As técnicas propostas podem apresentar diferentes graus de variabilidade amostral. O número amostral dos experimentos *in vivo* foi escolhido com base em artigos científicos que utilizam modelos experimentais semelhantes, bem como pelos

experimentos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa, mais precisamente no projeto de doutorado da aluna Fernanda Rodrigues (AMODEO et al., 2012; BOYKO et al., 2013; CHANG; COLE; COSTA, 2017; OLIVEIRA et al., 2021; PELLOW et al., 1985; ZOU et al., 2015; RODRIGUES et al., 2023).

Assim, para a realização do estudo principal serão necessárias 8 fêmeas por grupo para acasalamento (1 grupo controle, 1 grupo poli (I:C), 1 grupo LPS, totalizando 24 fêmeas). Para o acasalamento será necessário 1 rato macho para cada 2 fêmeas, o que totaliza 12 machos adultos. Cada ninhada será de cerca de 8 filhotes, assim, a partir das 24 fêmeas, estima-se um total de 192 filhotes. Ainda, serão necessários ratos juvenis de cerca de 21 dias para o teste de Reconhecimento Social, sendo 1 juvenil para cada 4 animais. Esse teste será realizado em 96 filhotes, portanto serão necessários 24 ratos juvenis.

Os dados referentes à prole das mães obesas serão obtidos a partir do projeto "Efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide sobre prejuízos comportamentais e neuroinflamatórios da prole de ratas obesas" previamente aprovado pela CEUA/UFCSPA (número 8/2022), e serão comparados aos dados obtidos no presente projeto.

5.4 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais adultos e juvenis serão submetidos a um jejum de 6 horas prévias a eutanásia, uma vez que este período é suficiente para gerar as melhores respostas de glicose e lipídeos em jejum sem que haja alteração nos marcadores de estresse, como ocorre em períodos superiores de jejum (NOWLAND et al, 2011).

As mães 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.

5.5 Testes comportamentais

5.5.1 Ordem dos testes comportamentais

Os animais adultos serão submetidos aos seguintes testes comportamentais na seguinte ordem: labirinto em cruz elevado, campo aberto, reconhecimento social e preferência à sacarose. A tarefa de campo aberto será realizada após 48 horas do término do labirinto em cruz elevado. Já a tarefa de reconhecimento social será realizada 24 horas após a tarefa de campo aberto, uma vez que o aparato do campo aberto e de reconhecimento é o mesmo e, portanto, a primeira tarefa serve como habituação da segunda. Por fim, o teste de preferência à sacarose será realizado por último em função das 24 horas de jejum necessárias, a fim de não interferir nas demais análises. Para isso, o período de jejum será iniciado 48 horas após o término do reconhecimento social (N = 12 machos e 12 fêmeas por grupo).

Os animais juvenis serão submetidos aos seguintes testes comportamentais na seguinte ordem: marble burying, campo aberto, habituação e desabituação social e labirinto em cruz elevado. Cada tarefa será realizada após 48 horas do término da anterior. A ordem das tarefas foi definida com base na variação dos ambientes nos quais são realizadas e do grau de estresse inerente a cada uma, uma vez que a primeira e a terceira são realizadas em uma caixa forrada com maravalha da própria gaiola do animal, enquanto a segunda e a quarta em seus próprios aparatos. Dessa forma, minimiza-se uma possível intervenção da associação entre o contexto e o aprendizado da tarefa (N = 12 machos e 12 fêmeas por grupo).

5.5.2 *Campo aberto*

Os animais serão testados inicialmente no paradigma de campo aberto, a fim de avaliar atividades locomotoras e exploratórias, estado emocional e comportamentos repetitivos. A tarefa é realizada em um aparato construído de madeira laminada escura, medindo 60 x 60 x 40 cm (largura x profundidade x altura), o qual o animal ficará livre para explorar por 10 minutos (FEYISSA et al., 2017).

As atividades locomotoras e exploratórias serão expressas pela distância total percorrida pelo animal no aparato, os níveis de ansiedade serão medidos pelo tempo despendido pelo animal nos quadrantes centrais do campo e pela contagem dos restos fecais excretados pelo animal durante o teste, e, por fim, o comportamento de grooming (ato de limpar as próprias vibrissas e pelos) será avaliado como índice de comportamento repetitivo do tipo-compulsivo.

As medidas de distância e permanência no centro serão aferidas de forma automatizada através de software especializado, enquanto o grooming e a contagem de fezes serão avaliados por um observador cego aos grupos experimentais.

5.5.3 *Labirinto em cruz elevado*

Os animais serão submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado a fim de avaliar comportamentos do tipo-ansioso, baseado na aversão natural dos roedores a áreas elevadas e abertas (PELLOW et al., 1985). O aparato possui quatro braços que surgem da mesma base (5 x 5 x 0,5 cm) a 50 cm do chão, sendo dois braços abertos (25 x 5 x 0,5 cm) e os outros dois fechados (25 x 5 x 16 cm).

O animal será posicionado no centro do aparato, voltado para um dos braços fechados, e ficará livre para explorar o espaço por 5 minutos (SCHRADER et al., 2018). Será mensurada a distância total percorrida, número de entradas em cada braço e o tempo de permanência em cada braço. Os dados serão avaliados de forma automatizada por software especializado.

5.5.4 Comportamento de enterrar esferas (Marble Burying)

O teste de enterrar esferas será utilizado para avaliar comportamento do tipo compulsivo, uma vez que roedores que apresentam comportamentos repetitivos/compulsivos tendem a enterrar um número muito superior de esferas quando comparados com animais controle (AMODEO et al., 2012; CHANG; COLE; COSTA, 2017).

Para isso, uma caixa acrílica semelhante a casa moradia do animal será forrada com maravalha limpa com 20 esferas de vidro aleatoriamente dispostas na superfície. O animal ficará livre na caixa por 30 minutos e, então, será registrado o número de esferas que foram enterradas. A esfera é considerada como enterrada quando pelo menos dois terços do seu volume se encontram cobertos por maravalha. Os dados serão avaliados por um observador cego aos grupos experimentais.

5.5.5 Preferência à sacarose

O teste de preferência à sacarose será utilizado conforme Boyko e colaboradores, a fim de avaliar comportamento do tipo-depressivo nos animais experimentais (BOYKO et al., 2013). O teste é dividido em três fases: na primeira fase, duas garrafas contendo sacarose 1% são colocadas nas gaiolas no lugar da água dos animais. Um dia depois, uma dessas garrafas é trocada por uma garrafa de água sem nenhum aditivo, e será mantida por mais 24 horas. Posteriormente, os animais serão deixados sem comida ou água por 24 horas. A terceira fase do teste é realizada após as 24 horas de jejum, consistindo em colocar nas gaiolas duas garrafas: uma contendo 100 mL de água e outra contendo 100 mL de sacarose 1%. Nessa fase, as garrafas são deixadas nas gaiolas por quatro horas, e, ao final, o consumo de sacarose e de água é quantificado. A preferência à sacarose é calculada conforme a fórmula $\text{Pref sacarose (\%)} = \frac{\text{consumo sacarose (mL)}}{\text{consumo sac (mL)} + \text{consumo água (mL)}} \times 100$.

5.5.6 Reconhecimento social

Os animais serão submetidos ao teste de reconhecimento social a fim de avaliar a capacidade de socialização, discernimento e preferência entre coespecíficos e objetos inanimados e a memória social desses.

O aparato é constituído por uma caixa de madeira laminada escura, medindo 60 x 60 x 40 cm (largura x profundidade x altura), e duas gaiolas acrílicas com o mesmo espaço entre si e as paredes do aparato. Num primeiro momento, é colocado um animal juvenil em uma das gaiolas e um objeto na outra, então o animal experimental adulto fica livre para explorar o aparato e as gaiolas por 10 minutos. 24 horas depois, é colocado o mesmo animal juvenil na primeira gaiola, e um segundo animal juvenil na gaiola onde anteriormente encontrava-se o objeto, então o animal adulto fica livre para explorar o aparato por 5 minutos. A tendência natural do animal é, no primeiro dia, explorar por mais tempo a gaiola contendo outro animal em relação à gaiola contendo um objeto e, no segundo dia, explorar por mais tempo a gaiola contendo o animal novo em relação à gaiola contendo o animal conhecido (GARRIDO ZINN et al., 2016).

O tempo de exploração das gaiolas pelo animal adulto será avaliado de forma automatizada por software especializado.

5.5.7 Habituação e desabituação social

O teste de habituação e desabituação social será utilizado a fim de analisar a capacidade de discriminação social através do olfato. Para isso, será apresentado a cada animal dois odores não sociais (extratos de plantas) e dois odores sociais (urina de outro animal) em swabs descartáveis. Cada odor será apresentado três vezes consecutivas, por 2 minutos cada vez. A tendência natural do animal é explorar por mais tempo os odores sociais em relação aos não sociais e, ainda, o tempo de exploração tende a decair ao longo das apresentações (habituação), voltando a crescer quando um novo odor é apresentado (desabituação) (ZOU et al., 2015).

O tempo de exploração dos swabs pelo animal será avaliado por um observador cego aos grupos experimentais.

5.6 Dosagens hormonais e de citocinas inflamatórias

Os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias serão determinados por ELISA utilizando kits comerciais.

5.7 Determinação de LPS por LC-QTOF

A quantificação das concentrações de LPS em amostras de plasma será realizada adaptando a metodologia propostas por Pais de Barros et al. 2015 (DE BARROS et al., 2015) Assim, alíquotas de 150 μ L de plasma serão hidrolisadas pela adição de 75 μ L de NaCl 150 mM e 300 μ L de HCl 8 mol, seguido pelo condicionamento a 90 °C por 4 horas. A extração do ácido 3-hidroxitetradecanoico, produto da hidrólise do LPS, será realizada pela adição de 4 mL de hexano. A fração coletada será evaporada sob fluxo de nitrogênio e ressuspensa em 20 μ L de solução contendo água e acetonitrila (4:1; v/v). Alíquotas de 10 μ L da amostra purificada serão injetadas em um sistema constituído por um cromatógrafo líquido Prominence UFLC (Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas binárias (LC-30AD), um forno para coluna (CTO-20A), um detector de absorvância de arranjo de diodos (SPD-M20A) e um injetor automático (SIL-20A). O sistema de LC é integrado ao analisador QTOF (do inglês, quadrupole-time-of-flight) em posição ortogonal e em série para alta resolução e precisão de massas, marca Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII. Os dados serão processados utilizando os softwares Data Analysis e HyStar™ (Bruker Corporation, Alemanha). As análises serão realizadas com ionização por eletrospray no modo negativo (ESI-, [M-H]-), empregando os seguintes parâmetros otimizados: tensão capilar de 5000 V; gás nebulizador a 3 bar; fluxo de gás de secagem de 6 L / h; temperatura de secagem de 200 ° C; faixa de massa m/z de 200 a 300 adquirida com uma taxa de espectro de 5 Hz; e os íons monocarregados m/z 243.1944 (pico monoisotópico; C12) e m/z 244.1980 (C13) serão monitorados para a quantificação. O equipamento será calibrado diariamente com uma solução de formato de sódio (10 mM) com um erro de massas inferior a 5 ppm.

5.8 Dosagem de neurotransmissores

Córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo serão homogeneizados em ácido fórmico 2%. Após adição de acetona, serão centrifugados por 6 min a 10000 rpm. O sobrenadante será coletado e submetido a um fluxo de ar sintético até a evaporação completa. O pallet será ressuspensionado em água e injetado no cromatógrafo para realização de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem.

5.9 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 GraphPad Prism 9.0.

6. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os testes comportamentais serão realizados nas salas de procedimento do biotério e a eutanásia dos animais será realizada no Laboratório de Fisiologia da UFCSPA. As dosagens de citocinas serão realizadas no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica da UFCSPA. A dosagem de neurotransmissores e de LPS serão dosados através dos equipamentos de cromatografia na Central Analítica da UFCSPA. Em conjunto, todos os laboratórios envolvidos dispõem dos equipamentos e da infraestrutura necessária para a realização das técnicas propostas neste estudo.

7. ORÇAMENTO

Kits de ELISA	R\$ 10.000,00
Reagentes diversos	R\$ 3.000,00
Material descartável	R\$ 2.000,00
TOTAL:	R\$ 15.000,00

Obs.: Os laboratórios envolvidos já contam com a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto. Os consumíveis necessários para este estudo serão adquiridos por meio de recursos institucionais (edital de fomento interno à pesquisa) e verba PROAP. O projeto também será submetido a agências de fomento para captação de recursos adicionais.

8. CRONOGRAMA

As atividades propostas neste projeto serão desenvolvidas no período de 24 meses, tendo seu início previsto após aprovação do CEUA-UFSPA, conforme tabela abaixo:

	1º Ano	2º Ano	3ª Ano
Acompanhamento dos animais, testes comportamentais e obtenção de amostras	x		
Dosagem de citocinas		x	
Dosagem de LPS e de neurotransmissores		x	
Apresentação de resultados preliminares	x	x	

Redação e defesa da dissertação		x	
Submissão de artigos, complementação de experimentos			x

REFERÊNCIAS

AMODEO, D. A. et al. Differences in BTBR T+ tf/J and C57BL/6J mice on probabilistic reversal learning and stereotyped behaviors. *Behavioural Brain Research*, v. 227, n. 1, p. 64–72, fev. 2012.

ARRODE-BRUSÉS, G.; BRUSÉS, J. L. Maternal immune activation by poly(I:C) induces expression of cytokines IL-1 β and IL-13, chemokine MCP-1 and colony stimulating factor VEGF in fetal mouse brain. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, p. 1–16, 2012.

ATLADÓTTIR, H. Ó. et al. Association of hospitalization for infection in childhood with diagnosis of autism spectrum disorders: A danish cohort study. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, v. 164, n. 5, p. 470–477, 2010.

BÖLTE, S.; GIRDLER, S.; MARSCHIK, P. B. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 7, p. 1275–1297, 2019.

BORRELL, J. et al. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats: Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, v. 26, n. 2, p. 204–215, 2002.

BOYKO, M. et al. The influence of aging on poststroke depression using a rat model via middle cerebral artery occlusion. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*, v. 13, n. 4, p. 847–859, 13 dez. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dados e estatísticas sobre transtorno do espectro do autismo | CDC, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>>

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.

DE BARROS, Jean-Paul Pais et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay [S]. *Journal of lipid research*, v. 56, n. 7, p. 1363-1369, 2015.

DECKMANN, I. et al. Neuroimmune alterations in autism: A translational analysis focusing on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *NeuroImmunoModulation*, v. 25, n. 5–6, p. 285–299, 2019.

EDLOW, A. G. Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. *Prenatal Diagnosis*, v. 37, n. 1, p. 95–110, 2017.

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.

GOTTFRIED, C. et al. The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Frontiers in Psychiatry*, v. 6, n. SEP, p. 1–16, 2015.

HADDAD, F. L.; PATEL, S. V.; SCHMID, S. Maternal Immune Activation by Poly I:C as a preclinical Model for Neurodevelopmental Disorders: A focus on Autism and Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 113, n. February 2019, p. 546–567, 2020.

KIRSTEN, T. B. et al. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: Relevance to autism. PLoS ONE, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2013.

LI, M. et al. The association of maternal obesity and diabetes with autism and other developmental disabilities. Pediatrics, v. 137, n. 2, p. 1–10, 2016.

LI, Y. M. et al. Association Between Maternal Obesity and Autism Spectrum Disorder in Offspring: A Meta-analysis. Journal of Autism and Developmental Disorders, v. 46, n. 1, p. 95–102, 2015.

MALKOVA, N. V. et al. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. Brain, Behavior, and Immunity, v. 26, n. 4, p. 607–616, 2012.

MILLER, M. T. et al. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: A mini review. International Journal of Developmental Neuroscience, v. 23, n. 2- 3 SPEC. ISS., p. 201–219, 2005.

OLIVEIRA, S. et al. Zinc Supplementation Decreases Obesity-Related Neuroinflammation and Improves Metabolic Function and Memory in Rats. Obesity, v. 29, n. 1, p. 116–124, jan. 2021.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. Behavioural Brain Research, v. 204, n. 2, p. 313–321, 2009.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. Journal of Neuroscience Methods, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 1985.

POTASIEWICZ, A. et al. Effects of prenatal exposure to valproic acid or poly(I:C) on ultrasonic vocalizations in rat pups: The role of social cues. Physiology and Behavior, v. 225, n. July, p. 113113, 2020.

REYNOLDS, L. C. et al. Maternal obesity and increased risk for autism and developmental delay among very preterm infants. *Journal of Perinatology*, v. 34, n. 9, p. 688–692, 2014.

RODRIGUES, Fernanda da Silva et al. Cannabidiol treatment improves metabolic profile and decreases hypothalamic inflammation caused by maternal obesity. *Frontiers in Nutrition*, v. 10, p. 385, 2023.

SCHRADER, A. J. et al. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking withinsubjects behavioral performance in rats (*Rattus norvegicus*). *PLOS ONE*, v. 13, n. 11, p.e0207804, 26 nov. 2018.

VIGLI, D. et al. Maternal Immune Activation in Mice Only Partially Recapitulates the Autism Spectrum Disorders Symptomatology. *Neuroscience*, v. 445, p. 109–119, 2020.

WALSH, C. A.; MORROW, E. M.; RUBENSTEIN, J. L. R. Autism and Brain Development. *Cell*, v. 135, n. 3, p. 396–400, 2008.

ZOU, J. et al. Methods to Measure Olfactory Behavior in Mice. *Current Protocols in Toxicology*, v. 63, n. 1, fev. 2015.

PROJETO DE PESQUISA

BIOFÍSICA COMPUTACIONAL APLICADA À SAÚDE

Rodrigo Ligabue Braun

Proponente

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Departamento de Farmacociências

A) TÍTULO

BIOFÍSICA COMPUTACIONAL APLICADA À SAÚDE

B) EQUIPE

B1. Proponente

Dr. Rodrigo Ligabue Braun. Professor Adjunto, UFCSPA
Pesquisador junto ao PPGBio-UFCSPA
Titulação: Doutorado (Biologia Celular e Molecular)

B2. Demais Membros da Equipe

MSc. João Pedro Nunes Sagini. Doutorando PPGBio-UFCSPA.
Titulação: Mestrado (Biociências)

MSc. Paula Bacaicoa Caruso. Doutoranda PPGBio-UFCSPA.
Titulação: Mestrado (Biologia Celular e Molecular)

Dra. Fernanda Cortez Lopes. Pós-doutoranda, Cbiot, UFRGS.
Pesquisadora junto ao Cbiot-UFRGS
Titulação: Doutorado (Biologia Celular e Molecular)

Dra. Helena M. Tannhauser Barros. Professora Titular, UFCSPA.
Pesquisadora junto ao PPGCS-UFCSPA.
Titulação: Doutorado (Neuropsicofarmacologia)

Dra. Juliana M. F. Miolo Schneider. Professora Adjunta, UFCSPA.
Pesquisadora junto ao PPGQ-UFRGS
Titulação: Doutorado (Química)

Dr. Marcio Dorn. Professor Adjunto, UFRGS.
Pesquisador junto ao PPGC-UFRGS e ao PPGBCM-UFRGS.
Titulação: Doutorado (Computação)

Dra. Marilu Fiegenbaum. Professora Associada, UFCSPA.
Pesquisadora junto ao PPGCS-UFCSPA.
Titulação: Doutorado (Genética e Biologia Molecular)

Dra. Tanira A. S. Aguirre. Professora Adjunta, UFCSPA.
Pesquisadora junto ao PPGCS-UFCSPA.
Titulação: Doutorado (Drug Delivery)

B3. Instituições Participantes

B3.1 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

B3.2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

C1. Bases Moleculares da Saúde e da Doença

A definição de saúde tem sofrido múltiplas alterações, podendo ser considerada um conceito multidimensional que envolve vários fatores, como integridade, aptidão e bem-estar (CONTI, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020), “saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social, não sendo a mera ausência de doença ou enfermidade”. Apesar de não considerar apenas os aspectos físico-anatômicos, ao curso do século XX, a saúde passou a ter uma conotação cada vez mais sub-microscópica e molecular (CONTI, 2018). Nesse contexto, promover saúde e combater enfermidades acabam sendo atividades que perpassam a descrição atomística da fisiologia humana. Ferramentas computacionais têm sido consideradas essenciais nessa empreitada, ao conferir altíssima resolução e precisão a medidas biofísicas não realizáveis em bancada (DROR et al., 2012; ORELLANA, 2019).

C2. Casos de Interesse

Diferentes condições patológicas podem ser estudadas sob a ótica da biofísica computacional. Dentre elas, podemos destacar patologias raras de origem genéticas, infecciosas emergentes de difícil manejo e transtornos neuropsiquiátricos. Além delas, aplicações cosméticas de toxinas e desenvolvimento de biocurativos com propriedades antibacterianas e pró-cicatrizantes também são áreas atraentes para aplicação de tais técnicas *in silico*.

Dentre as patologias genéticas raras, seriam alvo de descrições estruturais aquelas de origem monogênica, que ocorrem na população gaúcha e para as quais não existam justificativas moleculares para o fenótipo observado nos pacientes. Tais patologias incluem (mas não se limitam às) Síndrome de Kenny-Caffey (DECONTE et al., 2020) e Síndrome de Marshall-Smith (HERMAN & SIEGEL, 2015).

O Brasil reúne as condições necessárias para a emergência e reemergência de doenças infecciosas e parasitárias, devido às características de sua formação social, política, econômica e cultural, associadas a peculiaridades geográficas, climáticas e ecológicas (LUNA, 2002), sendo que a capacidade de detecção dos surtos de doenças emergentes melhorou pouco desde 1996, (KLUBERG et al., 2016). Entre as doenças infecciosas potencialmente emergentes no Brasil estão as febres hemorrágicas sul-americanas causadas por arenavírus (CHARREL & LAMBALLERIE, 2003) e a encefalite arboviral de Rocio (ELLWANGER et al., 2017),

constituindo alvos para descrição computacional de proteínas virais e de sua interação com alvos do hospedeiro.

Transtornos neuropsiquiátricos também são alvos da análise estrutural *in silico*, visto que ela é capaz de discernir entre famílias de receptores ao nível molecular (DUGGER et al., 2018). Transtornos convulsivos da infância e manejo da adição a drogas ilícitas (STAHL, 2013) são pontos de interesse do projeto.

Além de análises focadas em patologias, o desenvolvimento de agentes terapêuticos também será avaliado neste projeto. A adequação e o potencial de toxinas oriundas de peçonhas animais serão inspecionados via modelagem e simulação (SCHAGEN, 2017; LORES et al., 2018), assim como o comportamento de peptídeos candidatos à incorporação em matrizes poliméricas para o desenvolvimento de biocurativos (HAINLINE et al., 2018).

C3. Biofísica Computacional Aplicada ao Estudo Etiológico e ao Planejamento de Fármacos

O estudo da biologia estrutural de diferentes patologias empregando métodos computacionais tem aprofundado o conhecimento e proposto novos tratamentos para enfermidades humanas (SERDYUK et al., 2007). Estudos desse tipo têm sido capazes de explicar o funcionamento das doenças de agregação proteica, como Alzheimer e Parkinson, envolvendo a combinação de técnicas experimentais em bancada e computacionais (EISENBERG et al., 2006; UVERSKY & ELIESER, 2009). A identificação de inibidores de protease do HIV e da via de síntese de parede em micobactérias são exemplos da aplicação desses métodos em doenças infecciosas (EKINS & FREUNDLICH, 2013; GU et al., 2014).

Métodos de biofísica computacional englobam a bioinformática estrutural e o planejamento de fármacos assistido por computador, incluindo a modelagem, a dinâmica e o atracamento (*docking*) moleculares (SLIWOSKI et al., 2014; SERDYUK et al., 2007), e fazem parte das estratégias interdisciplinares para promoção de saúde (CONTI, 2018). Além disso, métodos computacionais apresentam a vantagem adicional de serem inerentemente biosseguros, permitindo o estudo de agentes infecciosos de forma estéril, mas altamente detalhada (ZHOU et al., 2018).

D) OBJETIVOS

Considerando a necessidade da aplicação de novas abordagens no combate a doenças e na promoção de saúde, o presente trabalho tem por **objetivo geral** aplicar técnicas de biofísica computacional a diferentes cenários patológicos e potenciais inovações farmacêuticas.

Especificamente, o projeto visa

- a. Explorar estruturalmente, por modelagem tridimensional, proteínas e outras biomoléculas envolvidas em diferentes patologias de interesse (genéticas, emergentes, neuropsiquiátricas);
- b. Avaliar computacionalmente biomoléculas com potencial cosmeto-farmacológico (toxinas e peptídeos antimicrobianos);
- c. Testar computacionalmente potenciais candidatos a moduladores das biomoléculas identificadas em “a” quanto ao seu perfil farmacocinético e potencial toxicidade;
- d. Avaliar os candidatos obtidos na etapa anterior quanto à ligação ao seu alvo molecular proposto, estimando suas afinidades computacionalmente;
- e. Identificar pontos na modulação biomolecular para combater doenças de maneira inovadora, ao conferir detalhamento em escala atômica à promoção de saúde.

E) METODOLOGIA

A modelagem das proteínas e peptídeos de interesse será realizada empregando técnicas baseadas em moldes estruturais. Para proteínas com moldes de identidade e tamanho adequados será aplicada a modelagem molecular comparativa clássica (MARTÍ-RENON et al., 2000). Para os casos em que tal abordagem não for possível, tal técnica será combinada ao reconhecimento de enovelamento (GODZIK, 2003), para casos de modelagem não trivial (KOSINSKI et al., 2003). A construção dos modelos será realizada com aplicação do programa Modeller 9.20 (SÁNCHEZ & ŠALI, 2000), enquanto a avaliação dos modelos obtidos será realizada por meio de ferramentas da plataforma SwissModel (ARNOLD et al., 2006). As estruturas molde serão identificadas com base em similaridade de sequência por busca BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) no RCSB Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000), e por identificação de padrões de enovelamento na plataforma PsiPred (BUCHAN et al., 2010).

A avaliação computacional de aspectos de absorção, distribuição, metabolização, excreção e potencial toxicidade dos compostos planejados será realizada com as plataformas

ADMET SAR 2.0 (FAN et al., 2018); SwissADME (DAINA et al., 2017), e PreADMET 2.0 (LEE et al., 2003).

A estimativa de afinidade dos candidatos a fármacos será realizada com a plataforma de atracamento molecular DockThor 2.0 (MAGALHÃES et al., 2014). A conservação de sítios estruturais entre ligantes e receptores será avaliada por meio de alinhamentos de sequências, empregando o meta-alinhador MCOFFEE (MORETTI et al., 2007), inspecionando posições que co-evoluem e cujas mutações ocorrem de forma acoplada (WANG et al., 2017; ZERIHUN & SCHUG; 2017; WEIGT et al., 2009). Tais posições serão mutadas e avaliadas quanto à diferença em sua energia livre de Gibbs em relação à proteína nativa, como maneira de estimar reduções ou aumentos na estabilidade da proteína. Adicionalmente, a varredura total das estruturas por “*Alanine scanning*” virtual (i.e., mutação individual de cada resíduo da proteína para alanina e avaliação do efeito da mutação sobre a estabilidade proteica) também será realizada. Estas avaliações energéticas serão realizadas com o pacote FoldX (SCHYMKOWITZ et al., 2005). Estruturas proteicas com mutações não desestabilizantes identificadas desta forma também serão empregadas para estimar afinidade pelos candidatos a antivirais por atracamento molecular.

As simulações por dinâmica molecular das proteínas em suas conformações nativas e ligadas aos candidatos a fármacos seguirão procedimentos previamente descritos (FELTES et al., 2018; VILLAVICENCIO et al., 2018; DE GROOT & GRUBMÜLLER, 2001), empregando o pacote de programas GROMACS 5 (ABRAHAM et al., 2015) e o campo de força AMBER99SB-ILDN (LINDORFF-LARSEN et al., 2010). As topologias para ligantes ausentes no campo de força serão geradas com o emprego da plataforma ATB (KOZIARA et al., 2014).

F) CRONOGRAMA

As etapas de execução do projeto ao longo de 120 meses, com o cronograma de atividades correspondentes, encontram-se esquematizados na Tabela I.

Tabela I. Cronograma de execução do projeto.

Etapa	Biênio				
	I	II	III	IV	V
Identificação de conservação evolutiva e efeito de mutações; Modelagem das proteínas de interesse envolvidas em síndromes genéticas raras					
Planejamento e avaliação teórica de potenciais agentes farmacomoduladores aplicados a proteínas envolvidas em síndromes genéticas raras					
Identificação de conservação evolutiva e efeito de mutações; Modelagem das proteínas de interesse envolvidas em infecções emergentes					
Planejamento e avaliação teórica de potenciais agentes farmacomoduladores aplicados a proteínas envolvidas em infecções emergentes					
Identificação de conservação evolutiva e efeito de mutações; Modelagem das proteínas de interesse envolvidas em transtornos neuropsiquiátricos					
Planejamento e avaliação teórica de potenciais agentes farmacomoduladores aplicados a proteínas envolvidas em transtornos neuropsiquiátricos					
Identificação de conservação evolutiva e efeito de mutações; Modelagem das toxinas de interesse com potencial aplicação cosmética					
Planejamento e avaliação teórica de modificações químicas aplicados a toxinas de interesse com potencial aplicação cosmética					
Identificação de conservação evolutiva e efeito de mutações; Modelagem dos peptídeos de interesse com potencial aplicação em biocurativos					
Planejamento e avaliação teórica de modificações químicas aplicados a peptídeos de interesse com potencial aplicação em biocurativos					
Redação de artigos científicos					

G) ORÇAMENTO

O projeto pode ser desenvolvido com a estrutura oferecida pelas Universidades participantes. O orçamento mínimo, caso fosse adquirido um computador de alta performance, é apresentado abaixo.

<i>Capital: Material permanente</i>	<i>Valor orçado*</i>
Computador: computador desktop multiprocessador de alto desempenho para modelagem e simulação molecular (incluindo teclado e mouse)	R\$ 13.000,00
No break: sistema de segurança elétrica para evitar interrupção de cálculos computacionais de longa duração	R\$ 2.000,00
<i>Total orçado:</i>	R\$ 15.000,00

*Os valores foram baseados em orçamentos obtidos no primeiro bimestre de 2020.

H) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, M.J., MURTOLA, T., SCHULZ, R., PÁLL, S., SMITH, J.C., HESS, B., LINDAHL, E., **2015**. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2:19-25.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J., **1990**. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403-410.
- ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J., SCHWEDE, T., **2006**. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22:195-201.
- BERMAN, H.M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T.N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I.N., BOURNE, P.E., **2000**. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28:235-242.
- BUCHAN, D.W., WARD, S.M., LOBLEY, A.E., NUGENT, T.C., BRYSON, K., JONES, D.T., **2010**. Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucl Acids Res*, 38:W563-W568.

- CHARREL, R.N., LAMBALLERIE, X., **2003**. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res*, 57:89-100.
- CONTI, A.A., **2018**. Historical evolution of the concept of health in Western medicine. *Acta Biomed*, 89:352-354.
- DAINA, A., MICHIELIN, O., ZOETE, V., **2017**. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep*, 7:42717.
- DE GROOT, B. L., GRUBMÜLLER, H., **2001**. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 294:2353-2357.
- DROR, R.O., DIRKS, R.M., GROSSMAN, J.P., XU, H., SHAW, D.E., **2012**. Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annu Rev Biophys*, 41:429-52
- DUGGER, S.A., PLATT, A., GOLDSTEIN, D.B., **2018**. Drug development in the era of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 17:183-196.
- EISENBERG, D., NELSON, R., SAWAYA, M.R., BALBIRNIE, M., SAMBASHIVAN, S., IVANOVA, M.I., MADSEN, A.Ø., RIEKEL, C., **2006**. The structural biology of protein aggregation diseases: Fundamental questions and some answers. *Acc Chem Res*, 39:568-575.
- ELLWANGER, J.H., KAMISNKI, V.L., CHIES, J.A.B., **2017**. Rocio virus: an overview. *RDGBM*, 1: 14-20.
- EKINS, S., FREUNDLICH, J.S., **2013**. Computational models for tuberculosis drug discovery. *Methods Mol Biol*, 993:245-262.
- FAN, D., YANG, H., LI, F., SUN, L., DI, P., LI, W., TANG, Y., LIU, G., **2017**. In silico prediction of chemical genotoxicity using machine learning methods and structural alerts. *Toxicol Res*, 7:211-220.
- FELTES, B.C., PEDEBOS, C., BONATTO, D., VERLI, H., **2018**. Dynamics of DDB2-DDB1 complex under different naturally-occurring mutants in Xeroderma Pigmentosum disease. *Biochim Biophys Acta*, 1862: 2579-2589.
- GODZIK, A., **2003**. Fold recognition methods. *Methods Biochem Anal*, 44, 525-546.
- GRANDE-PÉREZ, A., MARTIN, V., MORENO, H., DE LA TORRE, J.C., **2016**. Arenavirus Quasispecies and Their Biological Implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 392:231-276.
- GU, W.G., ZHANG, X., YUAN, J.F., **2014**. Anti-HIV Drug Development Through Computational Methods. *AAPS J*, 16:674-180.

- HAINLINE, K.M., FRIES, C.N., COLLIER, J.H., **2018**. Progress towards the clinical translation of bio-inspired peptide and protein assemblies. *Adv Healthc Mater*, 7: 10.
- HERMAN, T.E., SIEGEL, M.J., **2015**. Marshall-Smith syndrome. *J Perinatol*, 35:307-9.
- KOSINSKI, J., CYMERMAN, I.A., FEDER, M., KUROWSKI, M.A., SASIN, J.M., BUJNICKI, J.M., **2003**. A "FRankenstein's monster" approach to comparative modeling: merging the finest fragments of Fold-Recognition models and iterative model refinement aided by 3D structure evaluation. *Proteins*, 53 S6:369-379.
- KOZIARA, K.B., STROET, M., MALDE, A.K., MARK, A.E., **2014**. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies. *J Comput Aided Mol Des*, 28:221-233.
- LEE, S.K., LEE, I.H., KIM, H.J., CHANG, G.S., CHUNG, J.E., NO, K.T., **2003**. The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties, in *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*, Massachusetts: Blackwell Publishing.
- LINDORFF-LARSEN, K.; PIANA, S.; PALMO, K.; MARAGAKIS, P.; KLEPEIS, J. L.; DROR, R. O.; SHAW, D. E., **2010**. Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field. *Proteins: Struct Funct Bioinf*, 78:1950-1958.
- LORES, M., CELEIRO, M., RUBIO, L., LLOMPART, M., GARCIA-JARES, C., **2018**. Extreme cosmetics and borderline products: an analytical-based survey of European regulation compliance. *Anal Bioanal Chem*, 410: 7085-7102.
- LUNA, E.J.A., **2002**. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Rev Bras Epidemiol*, 5:229-243.
- MAGALHÃES, C.S., ALMEIDA, DM., BARBOSA, H.J.C., DARDENNE, L.E.D., **2014**. A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands. *Information Sci*, 289:206-224.
- MARTÍ-RENOM, M.A., STUART, A.C., FISER, A., SÁNCHEZ, R., MELO, F., ŠALI, A, **2000**. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 291-325.
- MORETTI, S., ARMOUGOM, F., WALLACE, I.M., HIGGINS, D.G., JONGENEEL, C.V., NOTREDAME, C., **2007**. The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Res*, 35:W645-W648.
- ORELLANA, L., **2019**. Large-Scale Conformational Changes and Protein Function: Breaking the in silico Barrier. *Front Mol Biosci*, 6:117.

- SÁNCHEZ, R., ŠALI, A., **2000**. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with Modeller. *Methods Mol Biol*, 143:97-129.
- SCHAGEN, S.K., **2017**. Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Results. *Cosmetics*, 4: 16
- SCHYMKOWITZ, J., BORG, J., STRICHER, F., NYS, R., ROUSSEAU, F., SERRANO, L., **2005**. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res*, 33:W382-W388.
- SERDYUK, I.N.; ZACCAI, N.R.; ZACCAI, J., **2007**. *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function*. Cambridge: Cambridge University Press.
- SLIWOSKI, G., KOTHIWALE, S., MEILER, J., LOWE, E.W. JR, **2014**. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev*, 66:334-395.
- STAHL, S.M., **2013**. *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- UVERSKY, V.N., ELIEZER, D., **2009**. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of α -synuclein. *Curr Protein Pept Sci*, 10:483-499.
- VILLAVICENCIO, B., LIGABUE-BRAUN, R., VERLI, H., **2018**. All-Hydrocarbon Staples and Their Effect over Peptide Conformation under Different Force Fields. *J Chem Inf Model*. [no prelo] doi: 10.1021/acs.jcim.8b00404.
- WANG, S., SUN, S., XU, J., **2018**. Analysis of deep learning methods for blind protein contact prediction in CASP12. *Proteins*, 86:67-77.
- WEIGT, M., WHITE, R.A., SZURMANT, H., HOCH, J.A., HWA, T., **2009**. Identification of direct residue contacts in protein-protein interaction by message passing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:67-72.
- WHO, **2020**. Constitution of WHO: Principles Disponível em « <http://www.who.int/about/mission/en/> » Acesso em 10mar2020.
- ZERIHUN, M.B.; SCHUG A., **2017**. Biomolecular coevolution and its applications: Going from structure prediction toward signaling, epistasis, and function. *Biochem Soc Trans*, 45:1253-1261.
- ZHOU, M., LI, Q., KONG, W., WANG R., **2018**. Experimental Methods Used for Identifying Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interaction, in *Targeting Protein-Protein Interactions by Small Molecules*, Cheng, C., Georg, G.I. (Eds.). Singapura: Springer Nature Singapore.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Flávia Pires Peña

**Desenvolvimento e caracterização de
uma formulação nanotecnológica
inovadora de Eudragit® L30-D55
contendo a associação da proteína S
do SARS-CoV-2 e do peptídeo CpG
para o tratamento da COVID-19**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2020**

Flávia Pires Peña

**Desenvolvimento e caracterização de
uma formulação nanotecnológica
inovadora de Eudragit® L30-D55
contendo a associação da proteína S
do SARS-CoV-2 e do peptídeo CpG
para o tratamento da COVID-19**

Projeto de Tese submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a o curso de
Doutorado acadêmico.

Orientador(a): Dr(a). Tanira Alessandra Silveira Aguirre
Coorientador(a): Dr(a). Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

**Porto Alegre
2020**

RESUMO

Coronaviridae é uma ampla família de coronavírus conhecidos até hoje capazes de causar diferentes doenças em humanos e animais. O SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) pertence a essa família, sendo transmitido principalmente por gotículas respiratórias e apresentando como sintomas de sua infecção são tosse seca, dificuldade de respirar, febre, dor de cabeça, dentre outras. Esses vírus possuem em sua superfície a proteína S, que lhes possibilita a entrada nas células hospedeiras. A nanotecnologia para aplicação em vacinas como uma forma de prevenção ou tratamento de doenças é uma alternativa que vem sendo utilizada. Essas nanovacinas induzem a resposta imunológica, entregam moléculas a tecidos específicos, protegem essas moléculas da degradação enzimática, além de que as nanopartículas de uma forma geral possuem liberação controlada, o que prolonga a meia-vida das vacinas, são biocompatíveis e biodegradáveis. Diferentes tipos de nanopartículas podem ser empregados em nanovacinas para entrega de moléculas, e as nanopartículas poliméricas são um desses sistemas nanoestruturados amplamente utilizados atualmente. Um exemplo de polímero que pode ser empregado para o desenvolvimento desses sistemas carreadores de moléculas é o Eudragit® L30-D55. Esse polímero é uma dispersão aquosa de polímeros aniônicos, solúvel em pH acima de 5,5. Para contornar problemas como a utilização de solventes orgânicos que gera desnaturação de antígenos, riscos ambientais, altos custos e bioincompatibilidade, o presente trabalho objetiva desenvolver e caracterizar suspensões de nanopartículas de Eudragit® L30-D55 sem a utilização de solvente orgânico, a fim de encapsular a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG.

Palavras-chave: Nanocápsulas, nanovacinas, proteína S, peptídeo CpG, Eudragit® L30-D55

ABSTRACT

Coronaviridae is a large family of coronavirus known to date capable of causing different diseases in humans and animals. SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) belongs to this family, being transmitted primarily via respiratory droplets, and presenting as symptoms dry cough, difficulty in breathing, fever, headache, and others. These viruses have an S protein on their surface, which allows them to enter host cells. The nanotechnology for application in vaccines as a form of prevention or a treatment of diseases is an alternative that has been used. These nanovaccines induce the immune response, deliver molecules to specific tissues, protect these molecules from enzymatic degradation, in addition to, in general, the nanoparticles having controlled release, which prolongs the half-life of vaccines, are biocompatible and biodegradable. Different types of nanoparticles can be used in nanovaccines to deliver molecules, and polymeric nanoparticles are one of those nanostructured systems widely used today. An example of a polymer that can be used for the development of these molecule carrier systems is Eudragit[®] L30-D55. This polymer is an aqueous dispersion of anionic polymers, soluble at pH above 5.5. To avoid problems like the use of organic solvents that cause denaturation of antigens, environmental risks, high costs, and bioincompatibility, this study aims at developing and characterizing suspensions of Eudragit[®] L30-D55 nanoparticles without organic solvent, to encapsulate the SARS-CoV-2 S protein and CpG peptide.

Keywords: Nanocapsules, nanovaccines, S protein, CpG peptide, Eudragit[®] L30-D55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de ligação e infecção do coronavírus às células-alvo.....	13
Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	14
Figura 3. Representação esquemática de sistemas nanoestruturados para entrega de moléculas em vacinas.....	19
Figura 4. Estrutura química do Eudragit® L30-D55.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de formulações nanotecnológica estudadas para aplicações em vacinas em diferentes doenças e suas fases de estudos.....	21
Tabela 2. Parâmetros utilizados para a metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. HIPÓTESES.....	9
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivo Geral.....	9
3.2. Objetivos Específicos.....	10
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
4.1. Coronavírus e Proteína S.....	10
4.2. Nanotecnologia.....	13
4.3. Vacinas e Nanovacinas.....	14
4.4. Eudragit®	23
5. MÉTODOS.....	25
5.1. Desenvolvimento das suspensões de nanopartículas.....	25
5.2. Caracterização das suspensões de nanopartículas.....	26
5.3. Estudos <i>in vitro</i>	28
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	29
8. ORÇAMENTO.....	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. Introdução

Os coronavírus são amplamente conhecidos por causarem doenças infecciosas em humanos e em animais. Diversos são os vírus da família *Coronaviridae* conhecidos até hoje, porém o SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave), o MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) e o SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) ganharam destaque nos últimos anos tendo em vista seu grande potencial de acometer o ser humano e causar desordens mais graves. Esses vírus possuem a capacidade de se replicar no trato respiratório inferior e causar pneumonia, que pode ser fatal dependendo do caso (RABI *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020). A infecção causada pelo SARS-CoV-2 tornou-se uma pandemia decretada pela Organização Mundial da Saúde em março de 2020, mas foi relatada pela primeira vez em Wuhan, na China, em dezembro de 2019 e desde então, vem se espalhando por todos os continentes devido a sua alta taxa de contaminação, ausência de tratamento e vacina preventiva (FLORINDO *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 é transmitido principalmente por gotículas respiratórias e os sintomas associados geralmente são tosse seca, dificuldade de respirar, hiposmia, febre, dores musculares e /ou articulares, dor de cabeça / tontura, náusea, diarreia e tosse com sangue (GUAN *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020). São vírus de RNA, que possuem a proteína pico (S) expressa na superfície, o que lhes confere a aparência característica de coroa dessa família (TUROŇOVÁ *et al.*, 2020). Essa proteína é a responsável pela ligação com receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e consequente infecção viral no hospedeiro (FLORINDO *et al.*, 2020; RABI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020).

Ainda não existe um tratamento ou uma vacina aprovada para Covid-19, mas pesquisas científicas anteriores serviram para embasar e direcionar o desenvolvimento de vacinas de forma mais ágil. O desenvolvimento de alternativas utilizando os sistemas nanoestruturados vem sendo muito explorados nessa área de promoção de saúde através de vacinas, que atuam eliminando infecções ou evitando que novas infecções ou doenças se propaguem (BHARDWAJ *et al.*, 2020; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). As nanovacinas oferecem diversas vantagens potenciais, destacando-se seu uso como adjuvante, indução da resposta imunológica inata e adaptativa, proteção da molécula frente a degradação

enzimática, atuar na melhora da estabilidade das formulações e entregar peptídeos ou proteínas a tecidos específicos (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

Diferentes tipos de nanopartículas podem ser empregados em nanovacinas para entrega de moléculas, como: lipossomas, virossomas, vesículas multilamelares reticuladas entre camadas (ICMVs), partículas semelhantes a vírus (VLPs), complexos imunoestimulatórios (ISCOMs), nanoemulsões, nanopartículas inorgânicas e nanopartículas poliméricas. No entanto, as partículas poliméricas são as formulações que mais têm se destacado devido sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, em especial as nanopartículas de PLGA, poli (D, L ácido láctico-co-glicólico) ou PLA, poli (ácido láctico) (BHARDWAJ *et al.*, 2020; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). Vacinas contendo nanopartículas de PLGA e PLA já foram utilizadas com antígenos do vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011), malária por *Plasmodium vivax* (MOON *et al.*, 2012), tétano (DIWAN; TAFAGHODI; SAMUEL, 2002), *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001) e ovalbumina (DEMENTO *et al.*, 2012).

Alternativas estão sendo testadas para o aprimoramento do uso de nanopartículas poliméricas em vacinas para a entrega de moléculas e a indução de da resposta imunológica. Estudos demonstraram que a associação de nanopartículas poliméricas com o peptídeo CpG aumentou a ativação de células dendríticas, gerou imunidade celular duradoura (DE TITTA *et al.*, 2013) e resultou em uma forte atividade de linfócito T citotóxico específico para o antígeno (BEAUDETTE *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2008). Isso pois o CpG é um oligonucleotídeo que atua como agonista do receptor Toll-Like 9 (TLR-9), promovendo respostas de células Th1 (BEAUDETTE *et al.*, 2009; DE TITTA *et al.*, 2013). Dependendo do seu tipo, o CpG pode atuar estimulando as células dendríticas (CD) a secretarem IFN- α , ou induzir as células B e CDs a amadurecer e segregar citocinas como interleucinas ou TNF- α (DE TITTA *et al.*, 2013).

O polímero Eudragit® L30-D55 é uma dispersão aquosa de polímeros aniônicos, contendo o ácido metacrílico como grupo funcional, que é solúvel em pH acima de 5,5. Esse biomaterial, possui resistência aos fluidos estomacais e solubilidade nos fluidos intestinais, logo é muito utilizado como polímero de revestimento entérico em *pellets*, em micro ou

nanopartículas (GASS *et al.*, 2005; GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017; RAHMAN; ALI, 2008).

Um grande desafio das técnicas de obtenção de nanopartículas com esses polímeros, é a utilização de solventes orgânicos, que pode gerar a desnaturação de antígenos, riscos ambientais, altos custos com o aumento de escala industrial além bioincompatibilidade (DATE *et al.*, 2010). Muitos avanços já foram feitos para a utilização de nanopartículas de Eudragit®, como a utilização do Labrasol® como agente solubilizante e estabilizador dos polímeros, porém em sua grande maioria, ainda são utilizados solventes orgânicos como acetona, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e etanol (DATE *et al.*, 2010; PINTO REIS *et al.*, 2006). Tendo em vista a escassez de alternativas mais sustentáveis e biocompatíveis disponíveis atualmente quanto ao desenvolvimento de nanopartículas, o presente trabalho visa desenvolver suspensões de nanopartículas de Eudragit® L30-D55 sem a utilização de solvente orgânico, a fim de encapsular a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG.

2. Hipóteses

Hipótese nula: O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados visando o encapsulamento da proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG, não será possível utilizando o polímero Eudragit® L30-D55, sem a presença de solventes orgânicos, pelo método de nanoprecipitação.

Hipótese alternativa: O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados utilizando o polímero Eudragit® L30-D55, visando o encapsulamento da proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG, sem a presença de solventes orgânicos, será possível pelo método de nanoprecipitação.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento e caracterização físico-química de suspensões de nanopartículas inovadoras de Eudragit® L30-D55 sem a utilização de solvente orgânico contendo a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Desenvolver suspensões de nanopartículas com o polímero Eudragit® L30-D55, sem a utilização de solventes orgânicos pelo método de nanoprecipitação;
- b) Caracterizar as suspensões de nanopartículas desenvolvidas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia;
- c) Encapsular a proteína S nas suspensões de nanopartículas desenvolvidas e caracterizá-las quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia;
- d) Incorporar o peptídeo CpG (citosina-guanina fosfodiéster) nas suspensões de nanopartículas desenvolvidas, via encapsulação ou via adsorção na superfície das partículas e caracterizá-las quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia;
- e) Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação da proteína S e do peptídeo CpG, a fim de realizar a determinação do teor e da taxa de encapsulação dos ativos nas nanopartículas;
- f) Avaliar o perfil de liberação da proteína S e do peptídeo CpG a partir das nanopartículas desenvolvidas;
- g) Avaliar a proliferação de células B pela técnica de vacinação *in vitro* com as formulações desenvolvidas.

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Coronavírus e Proteína S

Coronavírus, os vírus da família *Coronaviridae*, são assim conhecidos por possuírem em sua superfície pontas características que remetem a coroas e por causar doenças diarreicas e resfriados comuns em humanos. No entanto, o surgimento de espécies causadoras de doenças mais graves como SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) em 2003, que causou uma mortalidade de 10%, MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) em 2012, que causou uma mortalidade de 37% e SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) em 2019, que ainda encontra-se em contaminação em todos os continentes, demonstraram a importância desses agentes como patógenos emergentes (COLEMAN *et al.*, 2014; RABI *et al.*, 2020; SU *et*

al., 2020). Acredita-se que os três vírus tenham origem de espécies de morcegos, tendo o SARS-CoV-2, 79% de semelhança genética com o SARS-CoV humano, 98% de semelhança genética com coronavírus RaTG13 de morcego e alta similaridade com sequências de coronavírus de pangolim (um tamanduá escamoso) (TAY *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por meio de gotículas respiratórias suspensas no ar e estudos demonstraram que esses vírus apresentam afinidade pelos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que são encontrados em células epiteliais das vias aéreas, células epiteliais alveolares, células endoteliais vasculares e macrófagos do pulmão (TAY *et al.*, 2020). Estudos indicam que o SARS-CoV-2 possa infectar também o cérebro, tendo em vista a presença de receptores (ACE2) no endotélio, ou da placa cribiforme próxima ao bulbo olfatório (FLORINDO *et al.*, 2020). O período médio de incubação do vírus, tempo em que as pessoas estão infectadas, porém sem sintomas, é de 4-5 dias. Geralmente, os sintomas associados são tosse seca, dificuldade de respirar, hiposmia, febre, dores musculares e / ou articulares, dor de cabeça / tontura, náusea, diarreia e tosse com sangue, podendo estar presentes ou não, num período de 11,5 dias (GUAN *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

Os coronavírus são vírus envelopados, de RNA fita simples, que codificam quatro proteínas estruturais principais: S (pico), M (membrana), E (envelope) e N (nucleocapsídeo). Existem também regiões genômicas para codificação de proteínas específicas para a replicação viral além de outras proteínas, como protease principal do coronavírus (3CLpro) e protease tipo papaína (PLpro). Dentre as quatro proteínas estruturais principais, a proteína S é o principal foco para o desenvolvimento de vacinas, tendo em vista que é uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície do vírus, responsável pela ligação ao receptor e entrada do vírus nas células (COLEMAN *et al.*, 2014; FLORINDO *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2020; TUROŇOVÁ *et al.*, 2020). Os SARS-CoV-2 possuem a proteína S, que contém os domínios de ligação ao receptor, ou RBD. Esses domínios ligam-se a receptores da ACE2 localizados nas células de órgãos como rins, pulmões, coração e trato gastrointestinal de forma a tornar possível a entrada dos vírus nas células do hospedeiro (RABI *et al.*, 2020).

A proteína S é um trímero e exibe a organização do domínio das proteínas de fusão de classe I. Uma característica das proteínas dessa classe é a necessidade de ativação proteolítica por enzimas da célula hospedeira. A proteína S pode ser clivada na interface entre as subunidades S1 e S2 por furina. A subunidade funcional S1 (N-terminal S1 ou amino-terminal) abriga o receptor da célula hospedeira RBD, que se liga à receptores da ACE2 e inicia o processo de infecção. A subunidade funcional S2 (C-terminal S2) é a responsável pela fusão e âncora das membranas viral e celular. A clivagem da proteína S por furina está ligada à virulência *in vivo* dos coronavírus, dessa forma, a infecção celular é um processo complexo que depende da ligação do vírus ao receptor e do processamento proteolítico da proteína S para promover a fusão vírus-célula (FLORINDO *et al.*, 2020; GLOWACKA *et al.*, 2011; RABI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020).

Estudos indicam que a ligação do SARS-CoV-2 às células humanas ocorra da mesma forma como acontece nas infecções por SARS-CoV, tendo em vista a semelhança entre os dois vírus. Sabe-se que uma cascata de inflamação no trato respiratório inferior é desencadeada após a ocorrência da ligação do SARS-CoV aos receptores da ACE2 nos pulmões (RABI *et al.*, 2020). Esse fato ocorre, pois, a ACE2 atua na regulação do sistema renina-angiotensina (SRA). Dessa forma, após a infecção viral, e consequente ocupação desses receptores, ocorre uma desregulação do SRA (desregula a pressão arterial e o equilíbrio hidroeletrolítico), levando à um aumento da inflamação e permeabilidade vascular das vias aéreas (TAY *et al.*, 2020).

Basicamente, a infecção do SARS-CoV-2 ocorre após a ligação da proteína S ao receptor da ACE2 (Figura 1A) em células que expressam esse receptor e a serina protease transmembrana tipo 2, TMPRSS2. A TMPRSS2 atua no complexo, clivando a ACE2 e ativando a proteína S (Figura 1B), de forma a facilitar a entrada do vírus na célula (Figura 1C). Essa entrada e infecção viral nas células dos hospedeiros desencadeiam a piroptose delas, uma resposta imune e as células apresentadoras de antígeno (APC) desencadeiam uma cascata inflamatória. As APC apresentam o antígeno para células TCD₄ (Th1) e desencadeiam a liberação de interleucina-2, interleucina-12, IFN- γ e TNF- α , que promovem a estimulação de novos Th1. Esse aumento de células TCD₄, ativa duas vias no organismo: 1) estimula as células TCD₈ (T-Killer), que são as responsáveis por eliminar toda e qualquer célula contaminada por antígeno estranho; 2) estimula as células B a produzir anticorpos de memória para aquele patógeno. Esses processos juntos compõem a invasão e infecção celular

por SARS-CoV-2 além de processos de reconhecimento, neutralização, eliminação e geração de imunidade contra o vírus (RABI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

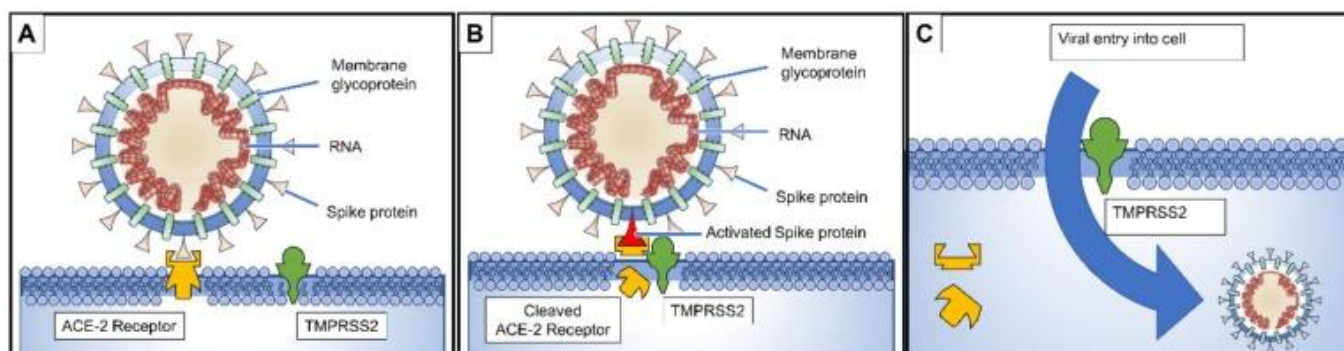


Figura 1: Modelo de ligação e infecção do coronavírus às células-alvo. Imagem extraída de Rabi *et al.*, 2020.

4.2. Nanotecnologia

A possibilidade de projetar e administrar no corpo humano nanopartículas que atuem na promoção da saúde vêm sendo amplamente estudada. Para a área farmacêutica, as nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm (MEDINA *et al.*, 2007). Existem diferentes tipos de nanopartículas, com variadas composições e métodos de preparação. Basicamente, as nanopartículas podem ser classificadas como orgânicas, sendo constituídas por partículas lipossomais e poliméricas (nanocápsulas ou nanoesferas), ou inorgânicas, sendo constituídas por partículas metálicas, cerâmicas ou baseadas em carbono (nanotubos de carbono e fulerenos) (MEDINA *et al.*, 2007). Dentre esses sistemas, destacam-se os lipossomas e as nanopartículas poliméricas para uso como sistema de liberação de fármacos, tendo em vista sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (BIZERRA; SILVA, 2016).

As nanocápsulas são sistemas reservatórios, constituídas por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Figura 2 a e b). Já as nanoesferas, não possuem núcleo em sua composição e apresentam uma matriz polimérica na qual o fármaco se encontra retido ou adsorvido (Figura c e d) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

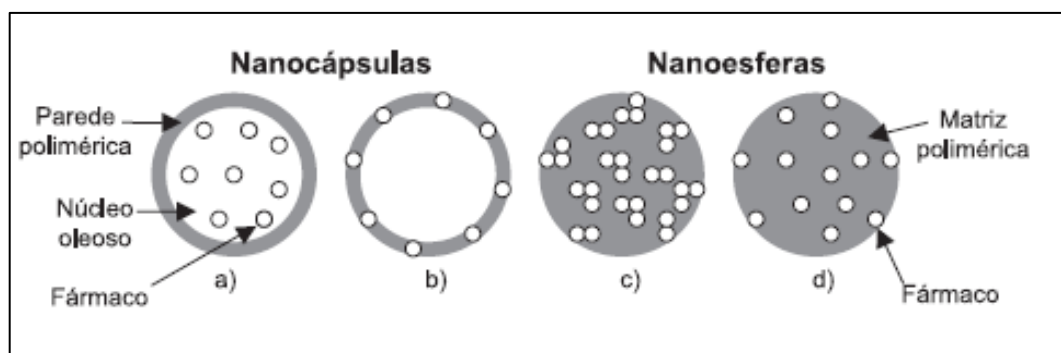


Figura 2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco incorporado na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Imagem retirada de Schaffazick *et al.*, 2003.

A utilização de nanocarreadores poliméricos para a liberação de fármacos permite o direcionamento e controle da liberação de ativos em sítios de ação específicos, maiores concentrações de fármaco no local desejado, redução de efeitos adversos e otimização da velocidade de entrega (BIZERRA; SILVA, 2016; POHLMANN *et al.*, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Tendo em vista suas vantagens, sistemas nanoestruturados têm sido aplicados como opção para o encapsulamento de fármacos antitumorais (BAETKE; LAMMERS; KIESSLING, 2015), peptídeos (CAO *et al.*, 2019), proteínas (PACHIONI-VASCONCELOS *et al.*, 2016) e vacinas (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

4.3. Vacinas e Nanovacinas

Historicamente, as vacinas foram uma das maiores revoluções na sociedade, transformando o modo de vida da população do século XX, por eliminar a maioria das doenças infantis que costumavam causar milhões de mortes infantis (RAPPUOLI *et al.*, 2011). No século XXI, as vacinas continuam protegendo a saúde da população, tendo em vista que novas doenças infecciosas surgiram e continuarão a surgir (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; RAPPUOLI *et al.*, 2011). Desde o início da vacinação, muitos casos históricos de sucesso envolvendo erradicação ou prevenção de doenças virais podem ser relatados como poliomielite, varíola, hepatite A, papiloma, difteria, tétano, sarampo, febre amarela e gripe (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; SULCZEWSKI *et al.*, 2018). No entanto, ainda não estão disponíveis vacinas eficazes contra muitos vírus clinicamente relevantes como HIV, vírus da hepatite C, Zika vírus e tuberculose (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Essa

falta de vacinas eficazes para certos tipos de vírus pode ser explicada por diversos fatores, como por exemplo: alta taxa de mutação viral, baixa imunogenicidade de antígenos virais recombinantes, instabilidade de proteínas antigênicas virais administradas *in vivo*, mecanismos sofisticados de evasão imune viral e indução ineficiente de imunidade da mucosa (SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Uma forma de contornar esses obstáculos, é a utilização de sistemas de entrega de vacinas baseados em nanopartículas, que otimizam a entrega dessas moléculas no local alvo, de forma a induzir resposta imunológica duradoura, reduzindo efeitos colaterais e forneça essas respostas a uma exposição mínima de doses (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

Existem disponíveis vacinas baseadas em organismos vivos atenuados ou inativados, de subunidades, toxóides (toxinas inativadas), combinadas, de RNA e DNA (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Essas vacinas, apesar de promissoras, apresentam algumas desvantagens como por exemplo: risco de reversão à virulência patogênica - para as vacinas de patógenos vivos atenuados; resposta imunológica fraca - para as vacinas de patógenos inativados; necessidade de componentes complexos no meio de cultura - para as vacinas à base de toxóides; ativação de oncogenes - para vacinas baseadas em DNA (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019). Por isso, é crescente a necessidade de desenvolver uma nova geração de vacinas com capacidade de atuar como imunógeno e adjuvante, sendo as nanopartículas uma formulação proposta para sanar esse problema.

Formulações nanotecnológicas para o desenvolvimento de vacinas podem atuar como adjuvantes, induzir a resposta imune inata e adaptativa, proteger o antígeno / molécula de degradação enzimática, melhorar a estabilidade das formulações, atuar como antígenos, auxiliar na entrega direcionada de um imunógeno às células apresentadoras de antígeno (APCs), entregar peptídeos ou proteínas a tecidos específicos e ajudar as células a gerar uma resposta imune mais forte (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Além disso, nanopartículas de uma forma geral possuem liberação controlada, o que prolonga a meia-vida das vacinas, são biocompatíveis, biodegradáveis e relativamente fáceis de produzir (ZOLNIK *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de sistemas nanoestruturados têm sido utilizados como adjuvantes, imunógenos e veículos de entrega de moléculas para ativação imunológica (LIN *et al.*,

2018). As nanovacinas compostas por esses sistemas possuem a capacidade de induzir a imunidade mediada por células e imunidade mediada por anticorpos, com indução de resposta de memória. A liberação prolongada de moléculas das nanopartículas tende a causar uma estimulação da resposta imunológica prolongada, aliviando a necessidade de doses de reforço. Dessa forma, as nanovacinas podem ser usadas como profiláticas (administradas antes da ocorrência da doença), ou terapêuticas (administradas após a ocorrência da doença). No entanto, para se obter melhores resultados, ainda devem ser otimizados parâmetros como segurança, biodistribuição e residência das nanopartículas no organismo (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

Modelos de nanopartículas utilizados para desenvolvimento de nanovacinas

Muito tem se buscado aprimorar as técnicas de desenvolvimento de nanovacinas. Diferentes tipos de nanopartículas têm sido amplamente utilizados como adjuvantes, imunógenos e veículos de entrega de antígenos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, cápsulas ou toxinas para ativação imunológica (BHARDWAJ *et al.*, 2020). Os modelos de nanopartículas usados mais frequentemente para o desenvolvimento de nanovacinas estão listados abaixo e representados na Figura 3:

- 1) Lipossomas - consistem em uma bicamada lipídica em torno de um núcleo aquoso, não tóxico e biodegradável, menos imunogênicos com propriedades físico-químicas ajustáveis, podendo ser unilamelar ou multilamelar (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).
 - a. Virosomas - consistem em uma bicamada lipídica conjugada com glicoproteínas virais específicas para receptores de células-alvos. São esféricos, mas, ao contrário do lipossoma, eles possuem um envelope vesicular viral unilamelar com materiais de vírus não infecciosos (SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Vacinas como Epaxal[®], contra hepatite A, Infelxal[®] V, contra influenza, Invivac[®] e NasalFlu[®], contra gripe, são vacinas virossomais aprovadas e comercializadas (ZHAO *et al.*, 2014).
 - b. Vesículas multilamelares reticuladas entre camadas (ICMVs) - consistem em nanovesículas construídas para estabilizar os lipossomas, reduzir sua

toxicidade e aumentar o tempo de liberação do antígeno / molécula *in vivo* (SULCZEWSKI *et al.*, 2018).

- 2) Partículas semelhantes a vírus (VLPs) – consistem em nanoestruturas de automontagem, sem ácido nucleico infeccioso, que são montadas a partir de proteínas estruturais virais, incapazes de se replicar, com alta densidade de epítomos. É possível acoplar na superfície dessas partículas, antígenos não proteicos e pequenas moléculas para produzir bioconjugados (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; ZHAO *et al.*, 2014). As VLPs têm recebido muita atenção por causa de sua facilidade de produção e capacidade de estimular fortes respostas imunológicas (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019). As vacinas baseadas em VLP são a primeira classe de nanovacinas a chegar no mercado, sendo a vacina para o vírus da hepatite B comercializada em 1986. As vacinas de VLP para o papilomavirus humano e hepatite E foram aprovados para uso em humanos em 2006 e 2011, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2014). Está em desenvolvimento uma vacina brasileira de VLP para o SARS-CoV – 2, sob coordenação do Doutor Jorge Kalil, em que o grupo de pesquisa visa conjugar sequências peptídicas do SARS-CoV-2 aos VLPs da proteína S utilizando-os como mecanismo de entrega de antígenos peptídicos aos componentes celulares do sistema imunológico.
- 3) Complexos imunoestimulatórios (ISCOMs) – são partículas semelhantes a gaiolas com cerca de 40 nm de tamanho, produzidas pela combinação do adjuvante saponina Quil A, colesterol, fosfolipídios e antígenos de proteínas, podendo ser utilizadas para aprisionar moléculas hidrofóbicas. Diversos antígenos têm sido usados para formar ISCOMs, incluindo antígenos derivados de influenza, vírus herpes simplex, HIV e doença de Newcastle (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2014).
- 4) Nanoemulsões – consistem em duas fases líquidas imiscíveis entre si, estabilizadas por um emulsificante para formar uma fase única. Essas nanovacinas podem ser formadas por nanopartículas nas formas óleo em água ou água em óleo, com o tamanho variando de 50 nm a 600 nm. As nanoemulsões podem transportar moléculas dentro do seu núcleo ou misturando-se com elas (KHEIROLLAHPOUR

et al., 2019; ZHAO *et al.*, 2014). Existem diferentes emulsões utilizadas como adjuvantes em vacinas comercializadas atualmente, como por exemplo, MF59 TM, uma emulsão óleo em água utilizada em vacinas contra a gripe; e Montanide TM, uma grande família de emulsões óleo em água e água em óleo, usadas em vacinas contra malária e febre aftosa (DAR *et al.*, 2013; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019).

- 5) Nanopartículas inorgânicas - consistem em nanoestruturas rígidas, de diferente formas (esféricos, hastes, cúbicos, camadas) e tamanhos, fabricados a partir de ouro, carbono, sílica, à base de alumínio, fosfato de cálcio, magnéticos, que induzem respostas humorais e celulares (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019). Por exemplo, nanopartículas de ouro têm sido usadas como adjuvantes em vacinas de DNA para vírus HIV (XU *et al.*, 2012), proteína (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019), vírus influenza (TAO; ZIEMER; GILL, 2014), febre aftosa (CHEN *et al.*, 2010), dentre outros.

- 6) Nanopartículas poliméricas – consistem em partículas formadas por diferentes polímeros, naturais ou sintéticos, que aprisionam a molécula ativa através de cápsulas ou redes poliméricas. Essas partículas apresentam características interessantes para aplicação em vacinas como: facilidade de preparação, estabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, citotoxicidade reduzida e possibilidade de ajustar as propriedades da superfície conforme necessário. Esses sistemas nanoestruturados possuem vantagens como: liberação sustentada, proteção das moléculas nanoencapsuladas contra o ambiente hostil e da degradação enzimática, entrega direcionada e efeitos adjuvantes. Além disso, controlar a taxa de liberação das nanovacinas é relativamente fácil, tendo em vista a possibilidade de alteração da composição ou proporção de copolímeros durante o processo de desenvolvimento das nanopartículas (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Vacinas baseadas em nanopartículas poliméricas já foram estudadas para transportar, por exemplo, vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011), *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013) e *Mycobacterium tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001).

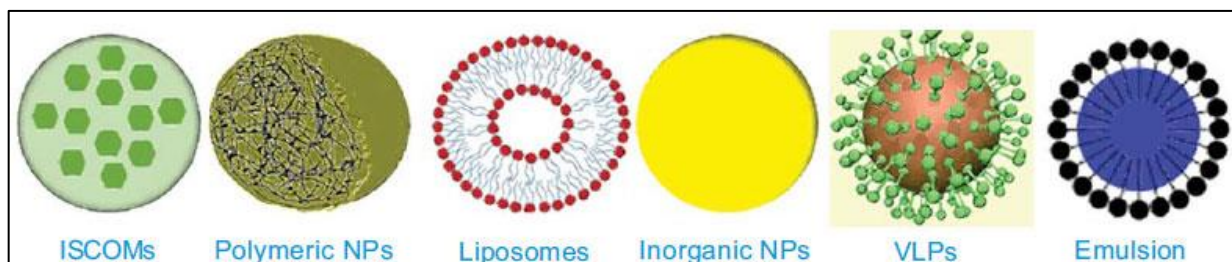


Figura 3: Representação esquemática de sistemas nanoestruturados para entrega de moléculas em vacinas. Imagem extraída de Kheirollahpour *et al.*, 2020

Nanopartículas poliméricas para uso em vacinas

Diversos polímeros sintéticos são utilizados para preparar nanopartículas visando aplicação em nanovacinas. Polímeros sintéticos como poli (D , L -lactídeo-co-glicolídeo) - PLG; poli (D , L ácido láctico-co-glicólico) – PLGA (THOMAS *et al.*, 2011); poli (ácido γ -glutâmico) - γ -PGA (AKAGI; BABA; AKASHI, 2011); poli (etilenoglicol) – PEG (SILVA *et al.*, 2016); e polímeros naturais como pululano (HASEGAWA *et al.*, 2006), alginato (LI *et al.*, 2013), inulina (SAADE *et al.*, 2013) e quitosana (FENG *et al.*, 2013) são utilizados para o encapsulamento de diferentes moléculas.

Nanopartículas de PLGA, ou PLA, poli (ácido láctico), são as partículas mais utilizadas na entrega e direcionamento de antígenos para as nanovacinas poliméricas, visando atuar nas células dendríticas e ativar respostas celulares potentes (BHARDWAJ *et al.*, 2020; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). Vacinas contendo nanopartículas de PLGA e PLA já foram utilizadas com antígenos do vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011), malária por *Plasmodium vivax* (MOON *et al.*, 2012), tétano (DIWAN; TAFAGHODI; SAMUEL, 2002), *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001) e ovalbumina (DEMENTO *et al.*, 2012). Nanopartículas de γ -PGA são compostas de poli (aminoácidos) anfifílicos, que se auto-organizam em nanomicelas com uma camada externa hidrofílica e um núcleo interno hidrofóbico e são usadas para encapsular moléculas hidrofóbicas (AKAGI *et al.*, 2005; AKAGI; BABA; AKASHI, 2011). Polímeros aniônicos obtidos do ácido acrílico como o PAA, ácido poliacrílico, são uma alternativa utilizada para a entrega de antígenos peptídicos e apresentam uma forte resposta imunológica (ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013).

Nanopartículas à base de quitosana (poli – D – glucosamina) têm sido amplamente estudadas tendo em vista as suas características como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, natureza não tóxica e capacidade de ser facilmente modificável quanto a sua forma e tamanho (AKAGI; BABA; AKASHI, 2011). Esses sistemas nanoestruturados foram utilizados em vacinas contra o vírus da hepatite B (BORGES *et al.*, 2008), vacinas contra a doença de Newcastle (ZHAO *et al.*, 2012) e vacinas de DNA para *Mycobacterium tuberculosis* (FENG *et al.*, 2013). A inulina pode ser utilizada como adjuvante em vacinas, como é o caso do Advax™, um adjuvante derivado da inulina, obtendo um aumento da resposta imune em vacinas contra vírus como influenza (HONDA-OKUBO; SAADE; PETROVSKY, 2012) e hepatite B (SAADE *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que administração intradérmica de nanopartículas poliméricas conjugadas com o peptídeo CpG aumentou a ativação de células dendríticas, gerou imunidade celular duradoura e resultou em uma eficácia de vacina comparável em dose de vacina ~ 400 vezes menor, quando comparada com o CpG livre (DE TITTA *et al.*, 2013). Alternativas estão sendo testadas para o aprimoramento do uso de nanopartículas poliméricas em vacinas para a entrega de moléculas. A utilização de partículas de hidrogel à base de poliacrilamida, que são instáveis em pH ácidos, contendo um antígeno modelo e o peptídeo CpG, quando em contato com o pH ácido endossomal, tiveram uma forte atividade de linfócito T citotóxico específico para o antígeno (BEAUDETTE *et al.*, 2009). Outro estudo utilizando o peptídeo CpG ODN em partículas de quitosana revestidas com alginato contendo o antígeno da Hepatite B, resultou em um aumento do anticorpo circulante específico (BORGES *et al.*, 2008). O CpG é um oligonucleotídeo que atua como agonista do receptor Toll-Like 9 (TLR-9), promovendo respostas de células Th1 (BEAUDETTE *et al.*, 2009; DE TITTA *et al.*, 2013). Dependendo do seu tipo, o CpG pode atuar estimulando as células dendríticas (CD) a secretarem IFN- α , ou induzir as células B e CDs a amadurecer e segregar citocinas como interleucinas ou TNF- α . Essa secreção de IFN- α promove as células T natural killer, ativa as células T CD8⁺ e citotoxicidade. A liberação de interleucinas induz respostas Th1 e maturação de células B, e o TNF- α estimula a maturação de CD e ativação de células T (DE TITTA *et al.*, 2013).

No entanto, as técnicas utilizadas para obtenção de nanopartículas baseadas nesses polímeros geralmente utilizam solventes orgânicos para a solubilização dessas macromoléculas, o que pode levar a desnaturação de antígenos. Dessa forma, o

desenvolvimento de técnicas alternativas de preparo de carreadores, como a obtenção de micropartículas por *spray drying* (AÑO *et al.*, 2011; PASTOR *et al.*, 2013) e métodos que não utilizem solventes orgânicos se faz necessário. Tendo em vista as características mencionadas das nanopartículas poliméricas, baixa toxicidade e a biocompatibilidade já conhecidas, tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*, essas formulações são candidatas promissoras para a continuidade das pesquisas pré-clínica e clínicas necessárias para aplicações terapêuticas.

Alguns exemplos de nanovacinas baseadas em sistemas nanoestruturados e seu estado clínico estão citados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Exemplos de formulações nanotecnológica estudadas para aplicações em vacinas em diferentes doenças e suas fases de estudos.

Doença	Sistema Nanoestruturado	Fase de estudo	Referência
Influenza	VLP	Pré-clínica	RAMIREZ <i>et al.</i> , 2018
Influenza	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	BABAPOOR <i>et al.</i> , 2011
Influenza	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	KARCH <i>et al.</i> , 2017
Influenza	Lipossoma	Fase I	BEEH <i>et al.</i> , 2013
Influenza	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	TAO; ZIEMER; GILL, 2014
Influenza	Nanofibras peptídicas de automontagem	Pré-clínica	SI <i>et al.</i> , 2018
Malária	Nanopartículas proteicas de automontagem	Pré-clínica	SETH <i>et al.</i> , 2017
Malária	Nanopartículas de óxido de ferro	Pré-clínica	PUSIC <i>et al.</i> , 2013
Malária	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	MCCOY <i>et al.</i> , 2013
HIV	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	EL BISSATI <i>et al.</i> , 2014
HIV	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	CLIMENT <i>et al.</i> , 2018
HIV	Nanopartículas de quitosana e ácido hialurônico	Pré-clínica	DACOBIA <i>et al.</i> , 2019
HIV	Lipossoma	Fase I	ROMÁN <i>et al.</i> , 2013
Tuberculose	Nanopartículas peptídicas de automontagem	Pré-clínica	CHESSON <i>et al.</i> , 2018
Pneumonia	Nanopartícula de polianidrido	Pré-clínica	WAGNER-MUÑIZ <i>et al.</i> , 2018
Vírus Sincicial Respiratório	Lipossoma	Pré-clínica	LIU <i>et al.</i> , 2015
Hepatite B	Nanoesferas de PLGA	Pré-clínica	THOMAS <i>et al.</i> , 2011
Toxoplasmose	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	EL BISSATI <i>et al.</i> , 2017
Dengue	Lipossoma	Pré-clínica	LIU <i>et al.</i> , 2015
Antraz	Nanoesferas de PLGA	Pré-clínica	MANISH <i>et al.</i> , 2013
Doença de Newcastle	Nanopartículas de quitosana	Pré-clínica	ZHAO <i>et al.</i> , 2012
Tétano	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	BARHATE <i>et al.</i> , 2014
Infecção enterohemorrágica	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	SANCHEZ-VILLAMIL; TAPIA; TORRES, 2019
Câncer	Nanoclusters de Fe ₃ O ₄	Pré-clínica	LI <i>et al.</i> , 2019
Câncer	PLGA	Pré-clínica	NIU <i>et al.</i> , 2019

Câncer de mama	Lipossoma	Fase I	HAMILTON <i>et al.</i> , 2012
Câncer de próstata	Nanopartícula de PLGA	Pré-clínica	CHEN <i>et al.</i> , 2019
Melanoma	VLP	Pré-clínica	MOHSEN <i>et al.</i> , 2019
Melanoma	Lipossoma	Fase I	SHEVTSOV; MULTHOFF, 2016
Melanoma	Gliconanopartículas de ouro	Pré-clínica	TERÁN-NAVARRO <i>et al.</i> , 2019
Linfoma de Hodgkin	Lipossoma	Fase I	SHEVTSOV; MULTHOFF, 2016
Glioblastoma	Lipossoma	Fase I-II	BLOCH <i>et al.</i> , 2014
Neuroblastoma	PLA-PEG	Pré-clínica	NGUYEN <i>et al.</i> , 2018
Asma alérgica persistente	VLP	Fase II	BEEH <i>et al.</i> , 2013

Tabela adaptada de Bhardwaj *et al.*, 2020.

Interações das nanopartículas

Para que as nanopartículas desempenhem seu papel como nanocarreadores de moléculas e potenciadores imunológicos, fatores como tamanho, forma, área de superfície, porosidade, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade na interação entre partícula e a célula-alvo devem ser avaliados (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Nanopartículas com um tamanho semelhante aos patógenos tendem a ser facilmente reconhecidas e absorvidas por células apresentadoras de antígeno (APCs) para indução da resposta imune (ZHAO *et al.*, 2014). As células dendríticas preferencialmente absorvem partículas de tamanho entre 20-200 nm, enquanto os macrófagos absorvem preferencialmente partículas maiores, 0,5-5 μm (XIANG *et al.*, 2006). A hidrofobicidade também interfere com a resposta imunológica. Nanopartículas poliméricas hidrofóbicas resultaram em uma maior indução de citocinas e moléculas coestimuladoras, ou seja, em uma resposta imunológica maior, quando comparada com nanopartículas poliméricas hidrofílicas (WATSON; ENDSLEY; HUANG, 2012; ZHAO *et al.*, 2014).

Quanto ao formato, foi demonstrado que nanopartículas esféricas foram capazes de induzir uma resposta imunológica mais forte do que nanopartículas em forma de cubo ou bastonete (NIIKURA *et al.*, 2013). Além disso, o formato desempenha papel fundamental na fagocitose por macrófagos, tendo em vista que a captação depende da interação entre as partículas e APCs (ZHAO *et al.*, 2014). A carga superficial das nanopartículas é responsável pela interação com moléculas superficiais congênicas presentes nas células alvo. Nanopartículas catiônicas são internalizadas mais eficientemente pelas APCs quando

comparadas com nanopartículas neutras. Essa internalização pode ser explicada devido às interações eletrostáticas entre as nanopartículas catiônicas com as membranas celulares aniônicas (FOGED *et al.*, 2005; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

A ativação de células T e B também depende da característica do sistema nanoestruturado utilizado para carrear a molécula de interesse. Antígenos encapsulados em lipossomas obtiveram uma melhor apresentação por APCs às células TCD4⁺, e nanopartículas de 200 nm aumentaram a expressão de MHC de classe I e II, além de produzir mais células TCD4⁺ específicas do antígeno quando comparada com nanopartículas de 30 nm (PERISÉ-BARRIOS *et al.*, 2014; STANO *et al.*, 2012). Além disso, células B normalmente são induzidas após o reconhecimento de estruturas altamente repetitivas (AGARWAL *et al.*, 2013). Dessa forma, nanopartículas modificadas, contendo altas concentrações de peptídeos ou proteínas virais, podem ser desenvolvidas para a aplicação de vacinas, gerando respostas humorais elevadas e duradouras quando comparadas com as mesmas vacinas na forma não encapsulada (AGARWAL *et al.*, 2013; SULCZEWSKI *et al.*, 2018).

Estudos demonstram também, que a associação de peptídeos e proteínas imunogênicas conjugados a superfície das nanopartículas ou encapsulados nessas partículas são capazes de ativar a proliferação de células B de forma muito mais eficaz do que somente com a molécula alvo encapsulada (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Uma única dose de nanopartículas de PLGA com ovalbumina (OVA) em sua superfície resultou em uma resposta imunológica mais forte, com mais geração de anticorpos *in vivo* quando comparado com OVA administrada livre (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

4.4. Eudragit®

Diversos são os polímeros de polimetacrilatos disponíveis comercialmente, podendo estar na forma de pó seco, dispersão aquosa ou solução orgânica. Esses polímeros podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros sintéticos de acordo com as proporções variáveis de metacrilatos de dimetilaminoetil, ácido metacrílico e ésteres de ácido metacrílico. São polímeros muito utilizados para proteção de moléculas com efeito terapêutico frente à degradação nas variações de pH do trato gastrointestinal, tendo em vista a variedade de

classes de polímeros disponíveis (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017). São exemplos desses polímeros: Eudragit® E100, utilizado como liberação gástrica; Eudragit® L100-55, utilizado como liberação entérica; Eudragit® L100 e Eudragit® S100, utilizado como liberação colônica; Eudragit® RLPO e Eudragit® RSPO, utilizado como liberação prolongada (DATE *et al.*, 2010).

Eudragit® L30-D55

O Eudragit® L30-D55 (Figura 4) é a dispersão aquosa de polímeros aniônicos, contendo o ácido metacrílico como grupo funcional (grupos carboxílicos livres e grupos éster na proporção 1:1) e sua estrutura está ilustrada abaixo na Figura 4. Esses grupos carboxílicos sofrem ionização em meio aquoso em pH acima de 5,5. Devido a essa característica, é um polímero muito utilizado em formulações para revestimento entérico tendo em vista sua solubilidade em fluidos intestinais e resistência aos fluidos estomacais (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017; RAHMAN; ALI, 2008). É um líquido de cor branca, baixa viscosidade, leve odor característico e apresenta miscibilidade em álcoois de acetona, HCl 1N e éter de petróleo (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015). Possui histórico de ser utilizado em micropartículas obtidas por *spray drying* (AÑO *et al.*, 2011; PASTOR *et al.*, 2013), como revestimento de *pellets* para proteção entérica (GASS *et al.*, 2005; RAHMAN; ALI, 2008), como polímero de partículas revestimento com rápida dissolução no intestino superior, em formulações de liberação controlada e entrega em locais específicos (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017).

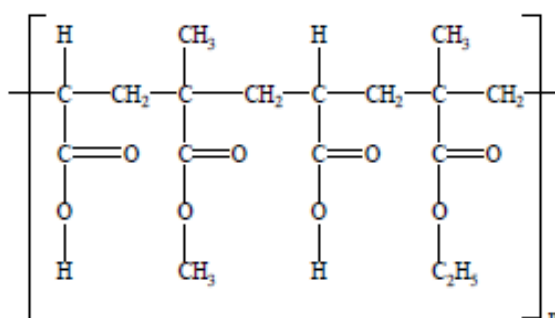


Figura 4: Estrutura química do Eudragit® L30-D55. Imagem extraída de Gupta *et al.*, 2015.

Nanopartículas de Eudragit® L30-D55 foram desenvolvidas pelo método de deslocamento de solvente com algumas modificações. Basicamente, após a secagem Eudragit® para obtenção de um pó, esse pó foi dissolvido em acetona e essa solução foi

adicionada lentamente a uma solução aquosa de PVA a 5%, com posterior homogeneização em alto cisalhamento. Após, prosseguiu-se com a rotaevaporação. Essa técnica gerou partículas de diâmetro médio de $368,6 \pm 7,2$ nm e potencial zeta médio de $-36,3 \pm 1,0$ mV (POOL *et al.*, 2012).

Muitos avanços têm sido feitos para o aprimoramento de nanopartículas de Eudragit® como carreadores de moléculas, no entanto, pouco desses estudos são focados em buscar alternativas que não utilizem solventes orgânicos para a fabricação dessas nanopartículas. Diferentes solventes orgânicos já foram utilizados até o momento para a fabricação de nanopartículas, como por exemplo, acetona, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e etanol (PINTO REIS *et al.*, 2006). O uso de solventes orgânicos na fabricação de nanopartículas representa uma preocupação por gerar riscos ambientais, não ser biocompatível e gerar altos custos com o aumento de escala industrial (DATE *et al.*, 2010).

Nanopartículas de Eudragit® RSPO, Eudragit® RLPO e Eudragit® EPO foram desenvolvidas utilizando somente o Labrasol®, um estabilizador anfifílico, muito utilizado para estabilizar microemulsões orais e tópicas. O Labrasol® foi utilizado como solubilizante e estabilizador para as nanopartículas a uma concentração final de 5% v/v, não precisando ser retirado da dispersão posteriormente por ser um solvente biodegradável com produtos de degradação seguros. Essas nanopartículas obtiveram um diâmetro médio e potencial zeta médio, respectivamente, de $125,4 \pm 4,25$ nm e $+ 39,6 \pm 1,6$ mV para Eudragit® RSPO; $92,4 \pm 1,30$ nm e $+ 42,3 \pm 2,1$ mV para Eudragit® RLPO e $141,9 \pm 2,85$ nm e $33,2 \pm 1,5$ mV para Eudragit® EPO (DATE *et al.*, 2010).

Não foram encontrados relatos disponíveis na literatura sobre o uso do Eudragit® L30 D55 no desenvolvimento de nanopartículas sem a utilização de solvente orgânico, visando a liberação imediata de proteínas em meios com pH acima de 5,5. É um campo de desenvolvimento muito restrito e talvez ainda não explorado, sendo este o objetivo deste trabalho.

5. Métodos

5.1. Desenvolvimento das suspensões de nanopartículas

As suspensões de nanopartículas serão desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação, sem a utilização de solvente orgânico para solubilização do polímero. Para isso, o polímero Eudragit® L30-D55 será solubilizado em uma solução aquosa em pH 5,5-

7,0, sendo essa a fase 1, que será injetada em uma fase 2, composta por um tampão em pH mais ácido e tensoativo. Nesse processo, o polímero tende a ficar insolúvel no meio devido à mudança de pH, ocorrendo o arranjo em partículas esféricas das cadeias poliméricas em suspensão coloidal. Ambas as fases ficarão sob agitação magnética constante, a 36 °C até total solubilização dos componentes. O excedente de solvente será eliminado por meio de evaporação por pressão reduzida até volume final desejado. Em formulações contendo a proteína S, essa será solubilizada na fase 1. Essa fase também poderá conter substâncias com caráter lipofílico a fim de serem obtidas nanopartículas com núcleo lipídico (nanocápsulas). Na fase 2, serão testados diferentes tensoativos para a estabilização das nanopartículas em suspensão coloidal.

Além disso, a incorporação do peptídeo CpG nas nanopartículas via encapsulação ou via adsorção na superfície das partículas será avaliada.

5.2. Caracterização das suspensões de nanopartículas

a) Caracterização físico-química

A determinação do *span* e do diâmetro de partículas para a suspensão de nanopartículas proposta será realizada por meio de difração de laser (Mastersizer® 2000, Malvern), com o intuito de realizar um rastreamento inicial da formulação e verificar a presença exclusiva ou não, das partículas na faixa nanométrica. Utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons em Zetasizer (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA) e a diluição adequada da amostra em água ultrapurificada, será possível obter a distribuição de tamanho de partículas e o índice de polidispersão da suspensão de nanopartículas. O potencial zeta da formulação proposta será obtido pela técnica de mobilidade eletroforética em Zetasizer (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA), após a diluição adequada da amostra em solução de NaCl 1mM. O diâmetro das partículas será rastreado também por Nanosight (Nanosight® LM10–NanoSight – Amesbury, Reino Unido). Já a determinação do pH, será realizada em potenciômetro calibrado, através da imersão direta do potenciômetro na formulação não diluída.

As análises serão realizadas em três momentos distintos: 1) com as nanopartículas intituladas brancas, que serão as formulações desenvolvidas sem a presença da proteína S e do peptídeo CpG; 2) com as nanopartículas na presença da proteína S e 3) com as nanopartículas na presença da proteína S e do peptídeo CpG. Todas as análises serão realizadas em triplicata.

b) Determinação do teor

Para a quantificação da proteína S e do peptídeo CpG, as formulações serão tratadas com solvente adequado, visando a dissolução das nanopartículas. Após as diluições necessárias, a solução final será filtrada para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um método previamente desenvolvido e validado; os parâmetros de partida para o desenvolvimento do método estão descritos na Tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros utilizados para a metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência

Fase estacionária	Coluna Shim-Pack CLC C8(M) (4,6 mm ×15 cm, 5 µm)
Modo	Fase reversa
Fase móvel	Acetonitrila acidificada com ácido trifluoracético a 0,05% (de 31% a 48%)
Vazão	1 mL/min
Comprimento de onda	214 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	40 °C
Tempo de leitura de cada amostra	18 minutos

c) Eficiência de encapsulação

A concentração de ativos encapsulados será determinada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação, considerando-se a diferença entre a concentração total do ativo na suspensão de nanopartículas (teor) e a concentração de ativo no meio de dispersão. Para isso, será necessário transferir uma determinada quantidade de suspensão de nanopartículas para uma unidade filtrante (Ultrafree Microcon 10000 MW, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e realizar a ultrafiltração-centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm, obtendo-se com isso, um ultrafiltrado de ativos não encapsulados, podendo ser quantificados por CLAE.

Após a obtenção das duas concentrações presentes na suspensão de nanopartículas (concentração de ativo total [Ct] e concentração de ativo no meio de dispersão [Cw]), a eficiência de encapsulação (EE) poderá ser calculada conforme a equação abaixo:

$$EE\% = \frac{Ct - Cw}{Ct} \times 100$$

d) *Análise morfológica*

A morfologia da suspensão de nanopartículas será avaliada através da microscopia eletrônica de transmissão, utilizando-se microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 ExII no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As análises serão realizadas em três momentos distintos: 1) com as nanopartículas intituladas brancas, que serão as formulações desenvolvidas sem a presença da proteína S e do peptídeo CpG; 2) com as nanopartículas na presença da proteína S e 3) com as nanopartículas na presença da proteína S e do peptídeo CpG. Todas as análises serão realizadas em triplicata.

5.3. Estudos *in vitro*

a) *Perfil de liberação das nanopartículas*

Será avaliado o perfil de liberação da proteína S na forma livre e associada às nanopartículas desenvolvidas, por Célula de Franz manual. Nesse sistema, existem dois compartimentos distintos, que serão separados por uma membrana de celulose. Um dos compartimentos é chamado de doador, no qual as nanopartículas contendo a proteína S ou a proteína S na forma livre serão depositadas, e o outro compartimento é chamado de acceptor, contendo uma solução em que essas formulações são solúveis, mantendo a condição de diluição *sink*. Alíquotas serão retiradas do compartimento acceptor nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 min e serão quantificadas por CLAE. O volume do compartimento acceptor será sempre preenchido com a mesma solução após cada coleta para manter a constância do meio. Os dados de concentração liberada *versus* tempo serão modelados utilizando o software Micromath Scientist®, utilizando equações mono e biexponenciais. Os perfis também serão avaliados segundo equações específicas, a fim de determinar o mecanismo de liberação das substâncias a partir dos sistemas nanoestruturados.

b) *Vacinação in vitro*

Células B de memória humanas purificadas por *sorting*, obtidas de sangue periférico de pacientes contaminados por SARS-CoV 2, selecionados previamente, serão estimuladas pela técnica de “vacinação *in vitro*”, em que os plasmablastos são estimulados em cultura em meio RPMI com as nanopartículas desenvolvidas contendo a proteína S e o peptídeo CpG por um período de 3 dias. Após 3 dias, as células serão tratadas com 10 ng de IL-3

humana por mais 3 dias de cultura. Essa estratégia comprovadamente garante uma proliferação robusta de células B *in vitro*, sem necessidade de ajuda de células T.

6. Análise estatística

As formulações desenvolvidas serão comparadas com relação à presença ou ausência da proteína S e do peptídeo CpG, quanto às análises físico-químicas realizadas nas nanopartículas. Os dados serão analisados estatisticamente por meio do teste T de *Student*, com intervalo de confiança de 95%. Os demais dados serão analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% e, quando identificada diferença significativa ($\alpha \leq 0,05$) para os ensaios realizados, será utilizado o teste de Tuckey para identificar quais grupos diferem estatisticamente dos demais. Todas as análises estatísticas serão realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.

7. Cronograma de atividades

Atividades	Tempo em semestres					
	1	2	3	4	5	6
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X
Realização das disciplinas	X	X	X	X	X	
Participação em Seminário Científicos	X	X	X	X	X	X
Participação em Seminário de Dados Experimentais	X	X	X	X	X	X
Participação em Referatas em grupo	X	X	X	X	X	X
Desenvolvimento das nanopartículas	X	X	X			
Caracterização físico-química das nanopartículas desenvolvidas		X	X			
Encapsulação da proteína S nas nanopartículas		X	X			
Caracterização físico-química das nanopartículas desenvolvidas		X	X			
Incorporação do peptídeo CpG nas nanopartículas			X			
Caracterização físico-química das nanopartículas desenvolvidas			X			
Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação da proteína S e do peptídeo CpG			X	X		
Avaliação do perfil de liberação das nanopartículas				X		
Avaliação da proliferação de células B por vacinação <i>in vitro</i>				X		
Realização da análise dos dados			X	X	X	X

Redação da Qualificação e Tese			X	X	X	X
Elaboração de artigo científico				X	X	X
Qualificação				X		
Defesa da tese						X

8. Orçamento

Descrição do Objeto	Quantidade	Unidade	Valor orçado por unidade	Valor total
Frasco Reagente 250 mL	2	250 mL	R\$ 20,70	R\$ 41,40
Frasco Reagente 500 mL	2	500 mL	R\$ 27,10	R\$ 54,20
Copo Bécker 100 mL	4	100 mL	R\$ 5,80	R\$ 23,20
Erlenmeyer 250 mL	2	250 mL	R\$ 13,70	R\$ 27,40
Barra magnética pequena	5	Unidade de 7X22 mm	R\$ 10,70	R\$ 53,50
Ácido orto-fosfórico 85% PA. Número CAS: 7664 -38 -2	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 48,90	R\$ 48,90
Álcool Etilico Absoluto 99,8% P.A. Número CAS: 64-17-5	4 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 19,10	R\$ 76,40
Caixa de Cubas Descartáveis DTS1070 para medição de Potencial Zeta ou tamanho de Partículas.	10	Caixa com 10 cubas descartáveis e 20 tampas	R\$ 3737,50	R\$ 3737,50
Luva nitrílica (Tamanhos PP, P, M, G)	400	Embalagem com 100 unidades	R\$ 79,00	R\$ 316,00
Filtro de seringa em PVDF – hidrofílico 0,45 µm x 25 mm.	100	Embalagem com 100 unidades	R\$ 335,00	R\$ 335,00
Ponteira sem filtro 5-200 µL, tipo Gilson, amarela.	1000	Embalagem com 1000 unidades	R\$ 12,00	R\$ 12,00
Ponteira sem filtro 100-1000 µL, tipo Gilson, azul.	1000	Embalagem com 500 unidades	R\$ 16,50	R\$ 33,00
Total			R\$ 4758,50	
Materiais disponíveis no laboratório				
Eudragit® L30-D55	1 L	Embalagem de 1000 mL	Doação da EVONIK	Doação da EVONIK
Monoestearato de sorbitano. Número CAS: 1338-41-6	250 g	Embalagem de 250 g	R\$ 940,00	R\$ 940,00
Triglicerídeo de cadeia média (TCM). Número CAS: 65381-09-1/73398-61-5.	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 90,00	R\$ 90,00

Polissorbato 80	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 93,70	R\$ 93,70
Ácido acético glacial 99,8% PA. Número CAS: 64-19-7	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 29,90	R\$ 29,90
Acetato de Sódio Trihidratado P.A. Número CAS: 6131-90-4	1000 g	Embalagem de 1000 g	R\$ 29,90	R\$ 29,90
Fosfato de Potássio Monobásico Anidro P.A. Número CAS: 7778-77-0	1000 g	Embalagem de 1000 g	R\$ 54,00	R\$ 54,00
Peptídeo CpG ODN (citossina-guanina fosfodiéster)	200 µg	Embalagem de 200 µg	R\$ 2166,01	R\$ 2166,01
Total			R\$ 3404,41	
Total estimado			R\$ 8162,91	

9. Referências bibliográficas

1. AGARWAL, R. *et al.* Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17247–17252, 2013.
2. AKAGI, T. *et al.* Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly(γ -glutamic acid) with L-phenylalanine as a protein carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 108, n. 2–3, p. 226–236, 2005.
3. AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. In: KUNUGI, S.; YAMAOKA, T. (Eds.). **Polymers in Nanomedicine**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 31–64.
4. AÑO, G. *et al.* A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholerae*. **Vaccine**, v. 29, n. 34, p. 5758–5764, 2011.
5. BABAPOOR, S. *et al.* A Novel Vaccine Using Nanoparticle Platform to Present Immunogenic M2e against Avian Influenza Infection. **Influenza Research and Treatment**, v. 2011, p. 1–12, 2011.
6. BAETKE, S. C.; LAMMERS, T.; KIESSLING, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. **British Journal of Radiology**, v. 88, n. 1054, 2015.
7. BARHATE, G. *et al.* Enhanced mucosal immune responses against tetanus toxoid using novel delivery system comprised of chitosan-functionalized gold nanoparticles

- and botanical adjuvant: Characterization, immunogenicity, and stability assessment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 11, p. 3448–3456, 2014.
8. BEAUDETTE, T. T. *et al.* In vivo studies on the effect of co-encapsulation of CpG DNA and antigen in acid-degradable microparticle vaccines. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 4, p. 1160–1169, 2009.
 9. BEEH, K. M. *et al.* The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 866–874, 2013.
 10. BHARDWAJ, P. *et al.* Advancements in prophylactic and therapeutic nanovaccines. **Acta Biomaterialia**, v. 108, p. 1–21, 2020.
 11. BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, n. 2, p. 1–12, 2016.
 12. BLOCH, O. *et al.* Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: A phase II, single-arm trial. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 2, p. 274–279, 2014.
 13. BORGES, O. *et al.* Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 405–416, 2008.
 14. CAO, S. JUN *et al.* Nanoparticles: Oral Delivery for Protein and Peptide Drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, p. 1–11, 2019.
 15. CHEN, Q. *et al.* Tumor growth inhibition by mSTEAP peptide nanovaccine inducing augmented CD8⁺ T cell immune responses. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, n. 6, p. 1095–1105, 2019.
 16. CHEN, Y. S. *et al.* Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. **Nanotechnology**, v. 21, n. 19, 2010.
 17. CHESSON, C. B. *et al.* Nanoscale Peptide Self-assemblies Boost BCG-primed Cellular Immunity Against Mycobacterium tuberculosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
 18. CLIMENT, N. *et al.* Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses.

- Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 339–351, 2018.
19. COLEMAN, C. M. *et al.* Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, v. 32, n. 26, p. 3169–3174, 2014.
 20. DACOBA, T. G. *et al.* Polysaccharide Nanoparticles Can Efficiently Modulate the Immune Response against an HIV Peptide Antigen. **ACS Nano**, v. 13, n. 5, p. 4947–4959, 2019.
 21. DAR, P. *et al.* Montanide ISATM 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. **Vaccine**, v. 31, n. 33, p. 3327–3332, 2013.
 22. DATE, A. A. *et al.* Organic solvent-free approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol. **Pharmazie**, v. 65, n. 10, p. 733–736, 2010.
 23. DE TITTA, A. *et al.* Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 49, p. 19902–19907, 2013.
 24. DEMENTO, S. L. . *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype Stacey. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4957–4964, 2012.
 25. DIWAN, M.; TAFAGHODI, M.; SAMUEL, J. Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1–3, p. 247–262, 2002.
 26. EL BISSATI, K. *et al.* Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for Toxoplasma peptide vaccine in HLA transgenic mice. **Vaccine**, v. 32, n. 26, p. 3243–3248, 2014.
 27. EL BISSATI, K. *et al.* Protein nanovaccine confers robust immunity against Toxoplasma. **npj Vaccines**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2017.
 28. FENG, G. *et al.* Enhanced Immune Response and Protective Effects of Nano-chitosan-based DNA Vaccine Encoding T Cell Epitopes of Esat-6 and FL against Mycobacterium Tuberculosis Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.
 29. FLORINDO, H. F. *et al.* Immune-mediated approaches against COVID-19. **Nature**

- Nanotechnology**, v. 15, n. 8, p. 630–645, 2020.
30. FOGED, C. *et al.* Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 2, p. 315–322, 2005.
 31. GASS, J. *et al.* Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: Implications for celiac sprue therapy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 674–684, 2005.
 32. GLOWACKA, I. *et al.* Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. **Journal of Virology**, v. 85, n. 9, p. 4122–4134, 2011.
 33. GUAN, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020.
 34. GUPTA, P.; KUMAR, M.; SACHAN, N. An Overview on Polymethacrylate Polymers in Gastroretentive Dosage Forms. **Open Pharmaceutical Sciences Journal**, v. 9, n. 1, p. 31–42, 2015.
 35. HAMILTON, E. *et al.* Phase I clinical trial of HER2-specific immunotherapy with concomitant HER2 kinase inhibition. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 28, 2012.
 36. HASEGAWA, K. *et al.* In vitro stimulation of CD8 and CD4 T cells by dendritic cells loaded with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan and NY-ESO-1 protein: Identification of a new HLA-DR15-binding CD4 T-cell epitope. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 6, p. 1921–1927, 2006.
 37. HONDA-OKUBO, Y.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. AdvaxTM, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. **Vaccine**, v. 30, n. 36, p. 5373–5381, 2012.
 38. KARCH, C. P. *et al.* Vaccination with self-adjuvanted protein nanoparticles provides protection against lethal influenza challenge. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 241–251, 2017.
 39. KHEIROLLAHPOUR, M. *et al.* Nanoparticles and Vaccine Development.

- Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 6–21, 2019.
40. LI, F. *et al.* Engineering Magnetosomes for High-Performance Cancer Vaccination. **ACS Central Science**, v. 5, n. 5, p. 796–807, 2019.
 41. LI, P. *et al.* Bio-reducible alginate-poly(ethylenimine) nanogels as an antigen-delivery system robustly enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 3, p. 271–279, 2013.
 42. LIMA, V. M. F. *et al.* Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5305–5312, 2001.
 43. LIN, L. C. W. *et al.* Advances and Opportunities in Nanoparticle- and Nanomaterial-Based Vaccines against Bacterial Infections. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 1–26, 2018.
 44. LIU, G. *et al.* Immunogenicity and efficacy of flagellin-envelope fusion dengue vaccines in mice and monkeys. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 5, p. 516–525, 2015.
 45. MANISH, M. *et al.* A Single-Dose PLGA Encapsulated Protective Antigen Domain 4 Nanoformulation Protects Mice against Bacillus anthracis Spore Challenge. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
 46. MCCOY, M. E. *et al.* Erratum: Mechanisms of protective immune responses induced by the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based, self-assembling protein nanoparticle vaccine (Malaria Journal (2013) 12 (136) doi:10.1186/1475-2875-12-136). **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, 2013.
 47. MEDINA, C. *et al.* Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552–558, 2007.
 48. MOHSEN, M. O. *et al.* Targeting mutated plus germline epitopes confers pre-clinical efficacy of an instantly formulated cancer nano-vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.
 49. MOON, J. J. *et al.* Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
 50. NGUYEN, F. *et al.* Enhanced Intratumoral Delivery of SN38 as a Tocopherol Oxyacetate Prodrug Using Nanoparticles in a Neuroblastoma Xenograft Model. **Clin Cancer Res.**, v. 24, n. 11, p. 2585–2593, 2018.

51. NIIKURA, K. *et al.* Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 3926–3938, 2013.
52. NIU, L. *et al.* Intradermal delivery of vaccine nanoparticles using hollow microneedle array generates enhanced and balanced immune response. **Journal of Controlled Release**, v. 294, n. November 2018, p. 268–278, 2019.
53. PACHIONI-VASCONCELOS, J. D. A. *et al.* Nanostructures for protein drug delivery. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 2, p. 205–218, 2016.
54. PASTOR, M. *et al.* An approach to a cold chain free oral cholera vaccine: In vitro and in vivo characterization of *Vibrio cholerae* gastro-resistant microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 247–258, 2013.
55. PATI, R.; SHEVTSOV, M.; SONAWANE, A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, 2018.
56. PATRA, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 33–45, 2017.
57. PERISÉ-BARRIOS, A. J. *et al.* Carbosilane dendrimers as gene delivery agents for the treatment of HIV infection. **Journal of Controlled Release**, v. 184, n. 1, p. 51–57, 2014.
58. PINTO REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
59. POHLMANN, A. R. *et al.* Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623–638, 2013.
60. POOL, H. *et al.* Polymeric Nanoparticles as Oral Delivery Systems for Encapsulation and Release of Polyphenolic Compounds: Impact on Quercetin Antioxidant Activity & Bioaccessibility. **Food Biophysics**, v. 7, n. 3, p. 276–288, 2012.
61. PUSIC, K. *et al.* Iron oxide nanoparticles as a clinically acceptable delivery platform for a recombinant blood-stage human malaria vaccine. **FASEB Journal**, v. 27, n. 3, p. 1153–1166, 2013.
62. RABI, F. A. *et al.* Sars-cov-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2020.

63. RAHMAN, M. A.; ALI, J. Development and in vitro Evaluation of Enteric Coated Multiparticulate System for Resistant Tuberculosis. **Indian J Pharm Sci**, v. 70, n. 4, p. 477–481, 2008.
64. RAMIREZ, A. *et al.* A virus-like particle vaccine candidate for influenza A virus based on multiple conserved antigens presented on hepatitis B tandem core particles. **Vaccine**, v. 36, n. 6, p. 873–880, 2018.
65. RAPPUOLI, R. *et al.* Vaccines for the twenty-first century society. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 865–872, 2011.
66. ROMÁN, V. R. G. *et al.* Therapeutic vaccination using cationic liposome-adjuvanted HIV type 1 peptides representing HLA-supertype-restricted subdominant t cell epitopes: Safety, immunogenicity, and feasibility in guinea-Bissau. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 11, p. 1504–1512, 2013.
67. SAADE, F. *et al.* A novel hepatitis B vaccine containing AdvaxTM, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, induces robust humoral and cellular immunity with minimal reactogenicity in preclinical testing. **Vaccine**, v. 31, n. 15, p. 1999–2007, 2013.
68. SANCHEZ-VILLAMIL, J. I.; TAPIA, D.; TORRES, A. G. Development of a gold nanoparticle vaccine against enterohemorrhagic escherichia coli o157:H7. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2019.
69. SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
70. SETH, L. *et al.* Development of a self-assembling protein nanoparticle vaccine targeting Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein delivered in three Army Liposome Formulation adjuvants. **Vaccine**, v. 35, n. 41, p. 5448–5454, 2017.
71. SHEVTSOV, M.; MULTHOFF, G. Heat shock protein-Peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–7, 2016.
72. SI, Y. *et al.* Intranasal delivery of adjuvant-free peptide nanofibers elicits resident CD8⁺ T cell responses. **Journal of Controlled Release**, v. 282, n. December 2017, p. 120–130, 2018.
73. SILVA, A. L. *et al.* PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking

- particle properties to immunogenicity. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 1056–1069, 2016.
74. STANO, A. *et al.* Nanoparticle size influences the magnitude and quality of mucosal immune responses after intranasal immunization. **Vaccine**, v. 30, n. 52, p. 7541–7546, 2012.
 75. SU, Q. DONG *et al.* The biological characteristics of SARS-CoV-2 spike protein Pro330-Leu650. **Vaccine**, v. 38, n. 32, p. 5071–5075, 2020.
 76. SULCZEWSKI, F. B. *et al.* Nanoparticle vaccines against viral infections. **Archives of Virology**, v. 163, n. 9, p. 2313–2325, 2018.
 77. TAO, W.; ZIEMER, K. S.; GILL, H. S. Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. **Nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 237–251, 2014.
 78. TAY, M. Z. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020.
 79. TERÁN-NAVARRO, H. *et al.* Pre-clinical development of Listeria-based nanovaccines as immunotherapies for solid tumours: insights from melanoma. **OncoImmunology**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2019.
 80. THOMAS, C. *et al.* Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 405–415, 2011.
 81. TUROŇOVÁ, B. *et al.* In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. **Science (New York, N.Y.)**, v. 370, n. 6513, p. 203–208, 2020.
 82. WAGNER-MUÑIZ, D. A. *et al.* Room temperature stable PspA-based nanovaccine induces protective immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–11, 2018.
 83. WALLS, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, 2020.
 84. WATSON, D. S.; ENDSLEY, A. N.; HUANG, L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. **Vaccine**, v. 30, n. 13, p. 2256–2272, 2012.

85. XIANG, S. D. *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2006.
86. XU, L. *et al.* Surface-Engineered Gold Nanorods: Promising DNA Vaccine Adjuvant for HIV-1 Treatment. **Nano Letters**, v. 12, n. 4, p. 2003–2012, 2012.
87. ZAMAN, M.; GOOD, M. F.; TOTH, I. Nanovaccines and their mode of action. **Methods**, v. 60, n. 3, p. 226–231, 2013.
88. ZHAO, K. *et al.* Preparation and Efficacy of a Live Newcastle Disease Virus Vaccine Encapsulated in Chitosan Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2012.
89. ZHAO, L. *et al.* Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2014.
90. ZOLNIK, B. S. *et al.* Minireview: Nanoparticles and the immune system. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 458–465, 2010.

1. PROPOSTA

Obtenção e análise de produtos de biotransformação dos compostos 25X-NBOHs

2. PROPONENTE

Tiago Franco de Oliveira. Possui bacharelado em Ciências Biomédicas (2007), doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas (2012) e pós-doutorado em Toxicologia (2013-2017). Atualmente é Professor Adjunto da UFCSPA, na área de conhecimento de Toxicologia Analítica, Ambiental, Forense e Social. Também é o coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPG-CS; Conceito CAPES 5) e líder do Grupo de Pesquisa em Espectrometria de Massas da UFCSPA. Concentra suas atividades de pesquisa na área de Espectrometria de Massas aplicada a Toxicologia, com diversas colaborações no cenário nacional e internacional. <http://lattes.cnpq.br/0040291517754373>.

3. ÁREA DE CONHECIMENTO PREDOMINANTE

Toxicologia e Análises Toxicológicas.

4. INSTITUIÇÃO PARTICIPANTES

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, RS.

Universidade Federal do Rio Grande do SUL, UFRGS, RS.

5. RESUMO

O consumo de substâncias psicoativas ilícitas é um notável problema de saúde pública, agravado nos últimos anos pelo surgimento das Novas Substâncias Psicoativas (NSP). No entanto, apesar do crescimento da apreensão dessas substâncias em cenários forense, há poucos estudos até o momento sobre seus efeitos tóxicos e ou ainda sua biotransformação. Assim, este projeto tem como objetivo principal identificar os produtos de biotransformação dos compostos da série 25X-NBOHs, uma categoria de NSP em rápida evolução e diversidade. O projeto prevê análises *in silico* sobre as previsões de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos NBOHs e substâncias correlacionadas por meio de plataformas especializadas, como Derekfor Windows, Sarah, Meteor e Vitic. Adicionalmente, análises *in vitro* serão realizadas para a validação dos achados *in silico*. Os compostos 25I-NBOH, 25B-NBOH e 25C-NBOH serão incubados com fração S9

microssomal humana para estudar os prováveis produtos de biotransformação dessas substâncias. A caracterização dos produtos de biotransformação encontrados *in vitro* será feita através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Adicionalmente, o projeto envolverá a exposição de células da linhagem HepG2 para investigar a formação de produtos de biotransformação das moléculas alvo e compreender melhor sua citotoxicidade.

6. CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

Designer drugs, *club drugs* ou Novas Substâncias Psicoativas (NSP), segundo a UNODC, são consideradas substâncias de abuso não controladas pela Convenção Única sobre Substâncias Narcóticas de 1961 ou pela Convenção de Substâncias Psicotrópicas de 1971 e que apresentam uma ameaça à saúde pública [1]. Estas podem ser análogas a drogas já controladas e a medicamentos ou totalmente novas, recentemente sintetizadas. Seu objetivo se centra em mimetizar efeitos psicoativos de medicamentos comercializados ou de outras substâncias controladas [2].

No Brasil, as NSP são classificadas pela Polícia Federal (PF) em: canabinoides sintéticos (análogos ao Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC), catinonas sintéticas (análogas às anfetaminas), substâncias do tipo cetamina e fenciclidina, feniletilaminas (derivadas da β -feniletilamina), piperazinas, substâncias de origem vegetal (como khat, kratom e *Salvia divinorum*), triptaminas, opioides sintéticos, aminoindanos e outras substâncias [3].

Feniletilaminas possuem uma presença estável no mercado de drogas, sendo encontradas todos os anos desde 2008 [4]. A estrutura da feniletilamina é base de diversos compostos, como anfetaminas, catinonas e compostos chamados de 2C [5]. Em 2013, o grupo de derivados da classe 2C chamado NBOMes ganhou espaço, tornando-se popular em vendas pela internet [6]. Em 2016, 2 anos após sua proibição no Brasil, a PF começou a identificar, em amostras de selos apreendidos, a presença de substâncias derivadas pertencentes à classe NBOH [7,8]. Esses compostos apresentam uma modificação sintética simples, troca de um substituinte metóxi por hidroxila, que confere melhora na afinidade de ligação e consequente atividade farmacológica [4].

Apesar da semelhança estrutural, os aspectos toxicológicos correlacionados com a cinética das NBOHs não estão totalmente elucidados, dificultando a conduta de profissionais de saúde em pacientes que apresentam intoxicação por estas drogas, uma vez que não são capazes de identificar sua presença em amostras biológicas.

Nesse contexto, mostra-se essencial o desenvolvimento de um estudo mais aprofundado acerca de seu perfil de biotransformação, a fim de permitir uma conduta mais assertiva e segura nos locais de atendimento.

Consumo de Drogas e Novas Substâncias Psicoativas

Em 2020, estima-se que 284 milhões de pessoas no mundo com idade entre 15 a 64 anos haviam utilizado drogas nos últimos 12 meses, o que representou um aumento de 26% com relação aos números obtidos em 2010. Estatísticas de 2020 indicam que a substância mais utilizada pelos usuários é a maconha, que abrangeu cerca de 209 milhões de usuários, seguida por opioides (61 milhões), anfetaminas (34 milhões), ecstasy (20 milhões) e cocaína (21 milhões) [9]. Em relação a estimulantes, a cocaína predominou nas Américas, enquanto anfetamina e metanfetamina prevaleceram na maior parte da Europa e Ásia. Isso se deve a fatores como disponibilidade, cultura de uso, e maior produção na região [9].

Apesar de pouco expressivo quando comparado às drogas clássicas (1% mundialmente) [9], as NSPs vêm sendo uma preocupação cada vez maior para as autoridades. Desenhadas propositalmente para fins ilícitos, possuem objetivo de evadir medidas de controle nacional e internacionalmente. São consideradas uma categoria de drogas comercialmente voláteis, pois podem sumir a partir do momento em que são banidas, além de não possuírem um mercado global grande e de longa data estabelecido. Isso faz com que seja ainda mais difícil de desenvolver métodos para identificá-las e estudar seus efeitos [1].

O número total de designer drugs reportadas à UNODC até 2021 corresponde a 1127, entre as quais 77 recém foram identificadas em 2020 – e 7 sem efeito determinado até a publicação do último relatório da instituição [1]. Entre as 77, 29% correspondeu a opioides sintéticos, 25% canabinoides sintéticos, 25% estimulantes, 9% sem efeito descrito, 6% dissociativos e 6% alucinógenos clássicos [1].

No Brasil, no ano de 2020, foram produzidos pela PF 594 laudos sobre drogas sintéticas, sendo 68,8% drogas clássicas, 13,1% outras drogas sintéticas e 8% feniletilaminas [3].

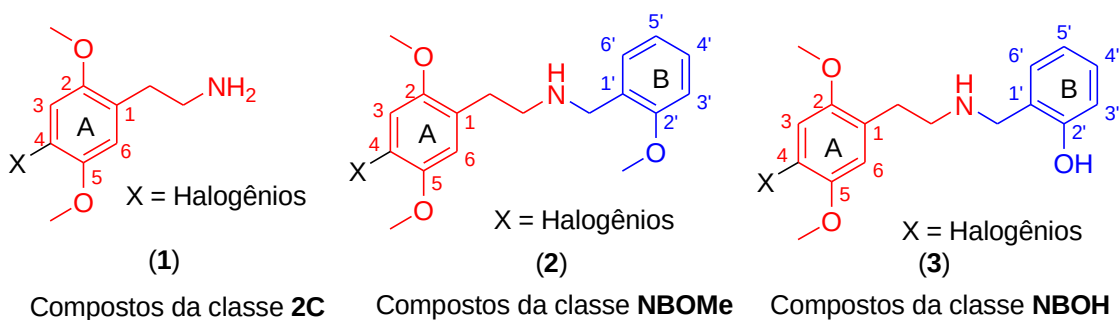
Feniletilaminas e NBOHs

Os derivados de feniletilaminas foram primeiramente sintetizados em 1970 por Alexander Shulgin [10], incluindo o grupo 2C (Grupo 1), os quais receberam essa

denominação em decorrência dos dois carbonos que separam a fenila da amina primária [11]. Esse grupo é caracterizado pela presença de grupos metóxi nas posições 2 e 5 da fenila e halogênios na posição 4 (**Figura 1**) [10]. As feniletilaminas compreendem substâncias que atuam como estimulantes ou como alucinógenos. A ação estimulante ocorre por meio de vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e/ou serotoninina, o que se assemelha a drogas como a cocaína, anfetamina e ecstasy. Por outro lado, as consideradas alucinógenas modulam ações específicas da serotonina, correspondendo ao LSD.

Os compostos 2C serviram como base para a criação de uma nova classe de club drugs, as 25-NBOMe (Grupo 2) [10]. A estrutura química dessas drogas apresenta o núcleo comum característico dos compostos 2C (feniletilamina trissubstituída), cujo grupo fenila é referido como anel A. Além disso, possui um grupo benzila ligado a amina (referido como anel B), o qual contém um substituinte metóxi na posição 2' do anel (**Figura 1**) [10]. As NBOMes foram sintetizadas por pesquisadores que estudavam a atividade de 5-HT_{2A}, possuindo uma alta afinidade para este receptor [10]. Em decorrência de seu efeito alucinógeno, começou a ser comercializado em 2013 como uma alternativa ao ácido lisérgico (LSD) [10]. Seus efeitos notificados incluem: aceleração do pensamento, introspecção, euforia, distorção do tempo, cores vibrantes e padrões extremos [10]. Apesar do caminho toxicocinético não ser ainda totalmente elucidado, já existem fatalidades associadas ao uso destas substâncias no Brasil e na Colômbia. Isso se explica por haver uma grande variância em sua potência, efeitos farmacológicos e toxicidade, o que torna erros em sua dosagem fatais [3]. Sintomas como taquicardia, hipertensão, agitação, hipertermia e convulsões já foram relatados [3].

Figura 1 – Estrutura química das feniletilaminas.



Estrutura química das feniletilaminas e suas respectivas classes: (1) Compostos da classe 2C; (2) Compostos da classe NBOMe e (3) Compostos da classe NBOH. Estão destacados em vermelho os átomos

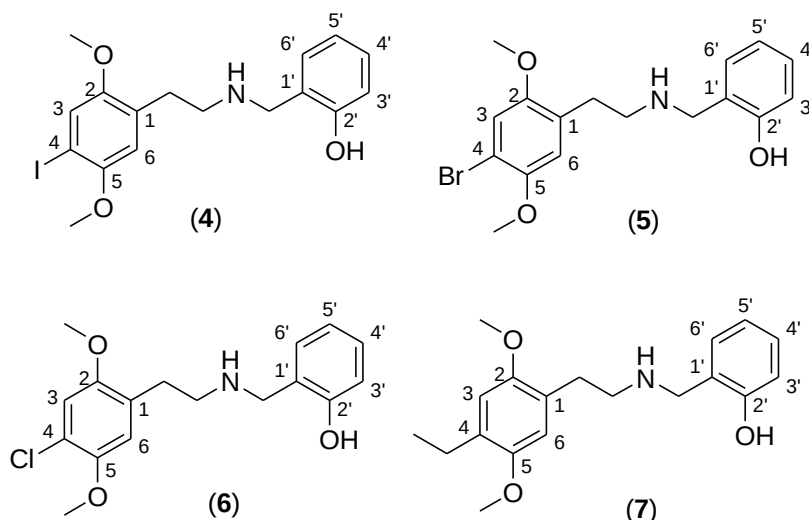
comuns ao núcleo 2C contendo o anel A. Em azul estão destacados os átomos da porção N-benzilsubstituída contendo o anel B. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Estrutura química das feniletilaminas e suas respectivas classes: (1) Compostos da classe 2C; (2) Compostos da classe NBOMe e (3) Compostos da classe NBOH. Estão destacados em vermelho os átomos comuns ao núcleo 2C contendo o anel A. Em azul estão destacados os átomos da porção N-benzilsubstituída contendo o anel B. Fonte: elaborado pelo autor.

Em fevereiro de 2014, esse grupo entrou para a Lista de Substâncias Controladas pela ANVISA [12], abrindo espaço para outras substâncias entrarem no mercado. No ano de 2016, a PF identificou pela primeira vez um grupo de substâncias quimicamente semelhantes chamadas de NBOH (3) [7,8]. Esses compostos apresentam um substituinte hidroxila na posição 2' do anel B no lugar de um grupo metóxi, presente nos NBOMes (**Figura 1**). Em 2017, a quantidade de laudos de 25I-NBOH (4) produzida pela PF já era maior que o total de NBOMes – proporção que aumentou constantemente ao decorrer dos anos [3]. No ano de 2021, das 657 apreensões de drogas sintéticas pela PF, a classe resultou em 76 identificações positivas, sendo 16 de 25B-NBOH (5), 11 de 25C-NBOH (6), 45 de 25E-NBOH (7) e 4 de 25I-NBOH (4) (**Figura 2**) [13]. Em quantidade de selos, as NBOHs superaram mais 55 mil [13].

Apesar de sua proeminência no cenário forense, ainda há poucos estudos sobre seus efeitos tóxicos e sua via de metabolização. Em pesquisa à base de dados PubMed, os termos 25I-NBOH, 25C-NBOH e 25B-NBOH retornam apenas 13 resultados, sendo, em sua maioria, desenvolvimento de métodos de identificação ou efeito farmacológico. Entretanto, foi possível encontrar 1 estudo envolvendo metabolismo, o qual caracteriza as enzimas envolvidas na biotransformação das substâncias 25I-NBOMe e 25I-NBOH, como também seus produtos [14].

Figura 2 – Principais NBOHs identificadas pela PF.



Principais NBOHs identificadas pela PF: (4) 25I-NBOH; (5) 25B-NBOH; (6) 25C-NBOH e (7) 25E-NBOH. Fonte: elaborado pelo autor.

Predição de biotransformação in silico

O metabolismo é uma característica intrínseca dos seres vivos e permite que os organismos criem um ambiente viável para realizar os processos bioquímicos que mantêm a homeostase [15]. Um dos processos metabólicos mais importantes que ocorrem no corpo humano é a biotransformação, que consiste na série de transformações que ocorrem com xenobióticos, compostos exógenos e estranhos ao organismo, com o objetivo de detoxificá-lo [15]. É considerada a principal linha de defesa contra substâncias estranhas ou perigosas, transformando-as em metabólitos excretáveis. Cerca de 75% das drogas são essencialmente depuradas por meio deste mecanismo [15].

A etapa de biotransformação pode ser dividida em duas fases. A fase I é realizada por enzimas microsossomais (como citocromo P-450), presentes, sobretudo, no fígado, que realizam os processos de hidrólise, oxidação e redução aumentando a polaridade e hidrossolubilidade das moléculas [16,17]. Na fase II, são efetuadas conjugações (glicuronidação, sulfonação, acetilação ou metilação) protagonizadas por enzimas citosólicas (sintetases e transferases). Isso resulta em um aumento significativo da polaridade das moléculas, possibilitando sua excreção urinária [16,17].

Os produtos de biotransformação gerados são normalmente utilizados para a detecção do uso de drogas de abuso em um intervalo que compreende de dias até meses após a exposição, dependendo da substância, frequência de uso e matriz analisada [17]. Devido à falta de dados disponíveis na literatura sobre a toxicocinética das substâncias 25-NBOH, tornou-se um desafio o desenvolvimento de métodos que consigam determinar NSP em amostras biológicas.

Uma forma de prever o comportamento farmacocinético de uma droga é por meio de métodos computacionais, uma vez que demandam menos tempo e dinheiro. Isso permite que os pesquisadores consigam acompanhar o constante surgimento de novas substâncias [18]. Além disso, permitem a compreensão de como a variação estrutural é relacionada ao potencial tóxico de um composto [18].

A toxicologia *in silico* utiliza modelos que podem ser codificados em ferramentas de *software* baseados em dados experimentais, relações estrutura-atividade e dados da literatura [15,19]. As metodologias mais utilizadas para a predição *in silico* são: baseadas em estatística (QSAR), na qual há um modelo matemático treinado com dados experimentais; baseadas em regras, as quais derivam da literatura ou análise de dados gerados por cientistas; e comparativa (*read-across*), que utiliza um desfecho conhecido de uma substância específica para prever o desfecho do composto de interesse [15,19].

Os sistemas inteligentes baseados em conhecimento possuem vantagens como a transparência das predições e a capacidade dos especialistas em desenvolverem regras para assimilar informações que não podem ser replicadas por análises automatizadas [19].

Investigação da biotransformação por fração microssomal S9

Entretanto, apesar do potencial de previsão da metodologia *in silico*, é essencial utilizar sistemas *in vitro* com material derivado de humanos a fim de prever com mais precisão e assertividade o comportamento de uma droga. Os principais modelos de estudos *in vitro* aplicados compreendem: fração citosólica, supersomas, microssomas hepáticos e não hepáticos e fração S9 [20].

Microssomas hepáticos correspondem a vesículas do retículo endoplasmático liso e são muito ricas em enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como citocromo P450, flavina monooxigenases, carboxil esterases, epóxido hidrolase e UDP glicuronil transferases [21]. Em decorrência disto, são muito utilizados para investigar o metabolismo dos xenobióticos [21]. Podem ser utilizados para a avaliação da oxidação da fase I pela adição do cofator NADP, e da glucoronidação da fase II pela adição de UDPGA [21]. Entre suas vantagens, destacam-se: baixo custo e facilidade no uso, fácil armazenamento, viabilidade de avaliação da variação interindividual, possibilidade em manter a atividade enzimática em formas cristalinas e ser um dos modelos mais bem caracterizados para a pesquisa de metabolismo de drogas [21]. Suas desvantagens compreendem: inadequação para estimativas quantitativas, devido à presença de CYPs e uridina difosfoglucuronosil transferases (UGTs) de alto nível, sem competição com

outras enzimas; e as condições de incubação *in vitro*, como pH, força iônica e solventes orgânicos usados, precisam ser controlados, pois podem afetar os resultados [21].

O citosol, por outro lado, contém enzimas de fase II, como glutathione S-transferase, N-acetiltransferase e sulfotransferase. Cofatores como acetilcoenzima A, ditioneitol e sistema regenerador de acetil CoA para NAT, adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato para ST e glutathione (GT) para GST são necessários [21]. A vantagem de utilizá-lo é a possibilidade de investigar separadamente ou em combinação, dependendo dos cofatores adicionados. Entretanto, apenas enzimas solúveis de fase II presentes no citosol hepático podem ser estudadas [21].

O modelo mais empregado para avaliação de oxidação (fase I) e reações de fase II é a fração S9, a qual é composta por frações citosólica e microsomal presentes no fígado, de humano ou de roedor [20]. Devido à diluição durante o processo de preparação, precisa ser suplementada com cofator (NADPH) para recuperar a atividade enzimática [15]. Em alguns casos, metabólitos que não são produzidos pela fração citosólica ou microsomal isoladamente são formados com as frações S9. Porém, como possui menor atividade enzimática quando comparada a ambos, pode fazer com que os metabólitos passem despercebidos [21].

Uma alternativa baseia-se na utilização de células para avaliar de forma mais completa o metabolismo hepático, já que são capazes de produzir metabólitos relevantes de fase I e II em concentrações comparáveis às encontradas *in vivo* [22].

Entretanto, a caracterização e a determinação dos produtos gerados é uma tarefa desafiadora, modulada por dificuldades derivadas em grande parte pela baixa concentração do produto formado, diversidade na estrutura e nas propriedades físico-químicas, interferência de matriz e instabilidade potencial. Atualmente, os sistemas de separação de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplados a espectrômetros de massa (MS) são os principais métodos para detectar e caracterizar o metabolismo de drogas [15]. O cenário ideal, neste caso, é a utilização da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), pois tem se demonstrado particularmente útil para a determinação de compostos com uma exata relação massa carga [22–24].

7. JUSTIFICATIVA

As NSPs englobam um número extenso de substâncias. Entre os anos de 2009 e 2021, 134 países reportaram 1127 NSPs ao sistema de alerta rápido da UNODC [2]. É uma categoria de compostos que evoluem muito rapidamente e que permanecem pouco

no mercado, além de serem muito diversificados [2]. Só na Europa, 52 foram identificadas pela primeira vez no ano de 2021 [25]. No Brasil, a classe das NBOHs vem apresentando um aumento crescente desde 2017, ano no qual a quantidade de laudos de 25I-NBOH (4) produzida pela PF já havia superado o total de NBOMes (3). No ano de 2021, das 657 apreensões de drogas sintéticas realizadas pela PF, a classe totalizou 76 identificações positivas, sendo 16 de 25B-NBOH (5), 11 de 25C-NBOH (6), 45 de 25E-NBOH (7) e 4 de 25I-NBOH (4) (**Figura 2**) [13]. Apesar de seu crescimento no cenário forense, há poucos estudos até o momento sobre seus efeitos tóxicos e sua metabolização. Isso prejudica a conduta de profissionais presentes em centros de atendimento, como clínicas de reabilitação e Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATox), uma vez que dificulta a identificação da substância nas amostras do paciente. Em vista de possibilitar mais assertividade aos profissionais de saúde, é essencial que estudos que visem caracterizar produtos de biotransformação dos compostos NBOHs sejam desempenhados.

8. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar os produtos de biotransformação dos compostos da série 25X-NBOHs por meio de abordagens *in silico* e *in vitro*.

Objetivo específicos

- i. Predizer parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos das substâncias por meio das plataformas Derek for Windows, Sarah, Meteor e Vitic;
- ii. Realizar experimentação *in vitro* de 25I-NBOH, 25B-NBOH e 25C-NBOH provenientes do Instituto Geral de Perícias, utilizando cofatores NADH e NADPH e fração S9 microsomal para o estudo de produtos de biotransformação;
- iii. Caracterizar os produtos de biotransformação encontrados *in vitro* por métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução;
- iv. Realizar a exposição de células da linhagem HepG2 para verificar a formação de produtos de biotransformação das moléculas alvo.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

Testes *in silico*

O desenho da estrutura dos compostos e a conversão em códigos SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) será realizada utilizando o programa ChemSketch 2022. Em seguida, os hidrogênios serão adicionados conforme o estado de protonação num pH igual a 7,4 e a canonização dos SMILES será realizada pelo programa OpenBabel 2.3.2 [26].

Os compostos terão seus metabólitos preditos através de programas e de servidores baseados em regras (e.g.: Lhasa Meteor Nexus [27], Biotransformer [28], GLORYx [29]). Esses programas e servidores são capazes de determinar possíveis metabólitos por meio de suas bases de dados que contém compostos semelhantes cujas reações de biotransformações são conhecidas empiricamente. Ademais, os programas podem ainda determinar subestruturas nos compostos de interesse e compará-los com a base de dados [30].

Da mesma forma, a toxicidade dos compostos e de seus metabólitos será determinada por ferramentas que fazem uso de diferentes técnicas, tais como: alertas estruturais, análise comparativa de análogos (*Read-across*) e baseados em relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR) [19,31]; dentre os quais se destacam: Lhasa Derek [27] e Sarah [32], Protox II [33], Vega QSAR [34]. Cabe salientar que o uso dos programas comerciais da empresa Lhasa dependem da disponibilidade da obtenção das licenças. No entanto, a empresa demonstrou interesse na execução do projeto de forma colaborativa

Reagentes, padrões e amostras

As substâncias 25I-NBOH, 25B-NBOH e 25C-NBOH foram cedidas pelo Instituto Geral de Perícias do Estado do Rio Grande do Sul (IGP-RS) por meio de colaboração científica com o grupo de Pesquisa em Espectrometria de Massas da UFCSPA. A fração S9, assim como os cofatores NADPH e NADH serão obtidos da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA). Acetonitrila, hexano, metanol e ácido fórmico grau LC/MS da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). Água purificada em sistema Milli-Q® (com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C), marca Millipore (Massachusetts, USA).

Instrumentação

Será utilizado o equipamento LC-HRMS constituído por um cromatógrafo líquido Prominence UFLC (Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas binárias (LC-30AD), um forno para coluna (CTO-20A), um detector de absorvância de arranjo de diodos (SPD-M20A) e um injetor automático (SIL-20A). O sistema de LC é integrado ao analisador QTOF (do inglês, quadrupole-time-of-flight) em posição ortogonal e em série para alta resolução e precisão de massas, marca Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII. Os dados serão processados utilizando os softwares Data Analysis e HyStar™ (Bruker Corporation, Alemanha).

Investigação da biotransformação de 25B-NBOH, 25C-NBOH e 25I-NBOH *in vitro* utilizando a fração S9

Para a realização dos experimentos *in vitro*, cada NBOH será testada separadamente. Para tanto, alíquotas de 5 µl contendo 100 ng de cada catinona sintética serão incubadas com 25 µl de fração S9, suplementado com os cofatores NADPH e NADH (25 µl de cada, em solução de 1mM), adicionalmente serão adicionados a cada amostra 25 µl de ditionitrito a 1mM e 45 µl de tampão fosfato de sódio (50 mM e pH 7), para a obtenção de um volume final de 150 µl de solução teste. Os experimentos serão incubados a 37 °C sob agitação, nos seguintes tempos: 15, 30, 60, 120 e 240 min. Incubações contendo apenas o sistema enzimático e controles, sem NBOH ou sem cofatores, serão realizados paralelamente.

Investigação da biotransformação de 25B-NBOH, 25C-NBOH e 25I-NBOH *in vitro* utilizando células HepG2

Células da linhagem HepG2, células de carcinoma hepatocelular humano, serão mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 15 % de soro bovino fetal, 10 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio. Será utilizado filtro com membrana de 0,22 µm para a esterilização do meio de cultura. As células serão incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ até o início do experimento. Para a realização da experimentação *in vitro*, cada NBOH será testada separadamente. Células HepG2, serão expostas a 100 µM de cada uma das substâncias por 24 horas. Ao término do período de incubação alíquotas do meio de cultura serão injetadas no sistema de LC-HRMS, para observação da formação de produtos de biotransformação e o decréscimo da molécula precursora.

Caracterização de produtos de biotransformação

Os produtos de biotransformação serão analisados em LC-HRMS em modo *data-independent acquisition* para a realização dos métodos *non-target*. Em seguida, serão aplicadas regras de fragmentação e de massas que possibilitam, por exemplo, a elucidação do número de carbonos, nitrogênios, insaturações e halogênios, assim como quais as possíveis ligações, que fragmentadas, geram fragmentos mais estáveis e por tanto mais frequentes. Por fim espera-se construir uma metodologia analítica para a determinação das moléculas selecionadas em amostras de urina de pacientes com suspeita de intoxicação por fenilaminas assistidos pelo CIT-RS.

10. CRONOGRAMA

As atividades previstas para a realização deste projeto foram incluídas no cronograma apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Cronograma de atividades a serem executadas de agosto de 2023 a Agosto de 2025 a fim de atingir os objetivos propostos.

Atividade/Trimestre	Mês 1 a Mês 6	Mês 7 a Mês 12	Mês 13 a Mês 18	Mês 19 a Mês 24
Revisão bibliográfica e definição da metodologia	X	X	X	X
Predição de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos	X			
Experimentação in vitro utilizando cofatores NADH e NADPH		X		
Exposição de células HepG2 e análise dos produtos de biotransformação			X	
Caracterização dos produtos de biotransformação in vitro		X	X	
Análise e interpretação dos resultados	X	X	X	X
Elaboração do relatório final e redação do artigo científico			X	X

Conforme disposto na **Tabela 2**, estão listados os reagentes, padrões e consumíveis necessários para a realização deste projeto, bem como os valores de cada um dos itens e custo total do projeto. Não haverá a necessidade de aquisição de equipamentos analíticos, uma vez que estes encontram-se disponíveis para utilização na Central Analítica e na central Bioanalítica da UFCSPA.

11. ORÇAMENTO

As atividades previstas para a realização deste projeto foram incluídas no cronograma apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 2 - Materiais a serem utilizados durante o desenvolvimento do trabalho, contendo quantidade e valor total (continua).

Materiais	Quantidade	Preço aproximado
Consumíveis para LC-HRMS (colunas cromatográficas, vials, inserts e solventes de eluição)	---	R\$ 5.000,00
Sais e reagentes diversos	---	R\$ 2.500,00
Células HepG2	1 vial	R\$ 4.500,00
Meio de cultura e suplementos	2 L	R\$ 3.000,00
Placas de Cultura	20	R\$ 500,00
Fração S9 Humana	1 vial	R\$ 1.500,00
Total		R\$ 17.000,00

12. REFERÊNCIAS

1. United Nations Office on Drugs and Crime. Drug market trends of Cocaine, Amphetamine-type stimulants and New Psychoactive Substances [Internet]. Vienna: UNITED NATIONS; 2022 jun [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: https://www.unodc.org/res/wdr2022/MS/WDR22_Booklet_4.pdf
2. Shafi A, Berry AJ, Sumnall H, Wood DM, Tracy DK. New psychoactive substances: a review and updates. Ther Adv Psychopharmacol [Internet]. janeiro de 2020 [citado 24 de junho de 2023];10:1–21. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2045125320967197>
3. Ministério da Justiça, Segurança Pública. Primeiro Informe do Subsistema de Alerta Rápido sobre Drogas [Internet]. 2022 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-protecao/politicas-sobre-drogas/subsistema-de-alerta-rapido-sobre-drogas-sar/primeiro-informe-sar-19-1-2022.pdf>
4. Arantes LC, Júnior EF, de Souza LF, Cardoso AC, Alcântara TLF, Lião LM, et al. 25I-NBOH: a new potent serotonin 5-HT_{2A} receptor agonist identified in

- blotter paper seizures in Brazil. *Forensic Toxicol.* 16 de fevereiro de 2017;35(2):408–14.
5. Scheid C. Avaliação da microextração líquido-líquido homogênea com solventes de hidrofiliabilidade comutável na determinação de MDMA, MDA e NBOMes em amostras de sangue postmortem. [Porto Alegre]: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2021.
 6. Ninnemann A, Stuart GL. The NBOMe Series: A Novel, Dangerous Group of Hallucinogenic Drugs. *J Stud Alcohol Drugs* [Internet]. 2013 [citado 24 de junho de 2023];74(6):977–8. Disponível em: doi:10.15288/jsad.2013.74.977
 7. United Nations Office on Drugs and Crime. The role of drug analysis laboratories in Early Warning Systems [Internet]. 2020 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/scientific/Drug-Analysis-Systems_EWS_EN.pdf
 8. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Relatório de Drogas Sintéticas - 2019 [Internet]. 2020 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: https://www.gov.br/pf/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/relatorio-de-drogas-sinteticas-2019/relatorio_drogas_sinteticas_2019.pdf
 9. United Nations Office on Drugs and Crime. Global overview of drug demand and drug supply [Internet]. Vienna: UNITED NATIONS; 2022 jun [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: https://www.unodc.org/res/wdr2022/MS/WDR22_Booklet_2.pdf
 10. Kristofic JJ, Chmiel JD, Jackson GF, Vorce SP, Holler JM, Robinson SL, et al. Detection of 25C-NBOMe in three related cases. *J Anal Toxicol.* 14 de julho de 2016;40(6):466–72.
 11. Poulie CBM, Jensen AA, Halberstadt AL, Kristensen JL. DARK Classics in Chemical Neuroscience: NBOMes. *ACS Chem Neurosci.* 28 de outubro de 2020;11(23):3860–9.
 12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada 06/2014 [Internet]. 2014 p. 1–36. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0006_18_02_2014.pdf
 13. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Relatório de Drogas Sintéticas - 2021 [Internet]. 2021 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: https://www.gov.br/pf/pt-br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/relatorio-de-drogas-sinteticas-2021/relatorio_drogas_sinteticas_2021___versao_final___revisado_ljm___edb_assinado_assinado.pdf
 14. Nielsen LM, Holm NB, Leth-Petersen S, Kristensen JL, Olsen L, Linnet K. Characterization of the hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 25I-NBOMe and 25I-NBOH. *Drug Test Anal.* 16 de junho de 2017;9(5):671–9.
 15. Kirchmair J, Göller AH, Lang D, Kunze J, Testa B, Wilson ID, et al. Predicting drug metabolism: Experiment and/or computation? *Nat Rev Drug Discov.* 24 de abril de 2015;14(6):387–404.

16. Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang & Dale Farmacologia. 9o ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional; 2022. 1–763 p.
17. Oga S, Camargo MM de A, Batistuzzo JA de. Fundamentos de Toxicologia. 4o ed. Atheneu; 2014. 1–705 p.
18. de Melo EB, Martins JPA, Rodrigues CHP, Bruni AT. In silico Risk Assessment Studies of New Psychoactive Substances Derived from Amphetamines and Cathinones. J Braz Chem Soc. 1o de maio de 2020;31(5):927–40.
19. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, et al. In silico toxicology protocols. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 17 de abril de 2018;96:1–17.
20. Calixto LA. Métodos de análise de rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo in vitro. [Ribeirão Preto]: Universidade de São Paulo; 2012.
21. Asha S, Vidyavathi M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-A review. Appl Biochem Biotechnol. 7 de julho de 2009;160(6):1699–722.
22. Swortwood MJ, Ellefsen KN, Wohlfarth A, Diao X, Concheiro-Guisan M, Kronstrand R, et al. First metabolic profile of PV8, a novel synthetic cathinone, in human hepatocytes and urine by high-resolution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 16 de maio de 2016;408(18):4845–56.
23. Pedersen AJ, Reitzel LA, Johansen SS, Linnet K. In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases. Drug Test Anal. 9 de maio de 2012;5(6):430–8.
24. Kinyua J, Negreira N, McCall AK, Boogaerts T, Ort C, Covaci A, et al. Investigating in-sewer transformation products formed from synthetic cathinones and phenethylamines using liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Science of the Total Environment. 1o de setembro de 2018;634:331–40.
25. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2022: Trends and Developments [Internet]. 2022. Disponível em: www.emcdda.europa.eu
26. O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An Open chemical toolbox. J Cheminform. 7 de outubro de 2011;3(10).
27. Marchant CA, Briggs KA, Long A. In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: Derek for windows, meteor, and vitic. Toxicol Mech Methods. 9 de outubro de 2008;18(2–3):177–87.
28. Wishart DS, Tian S, Allen D, Oler E, Peters H, Lui VW, et al. BioTransformer 3.0 - a web server for accurately predicting metabolic transformation products. Nucleic Acids Res. 10 de maio de 2022;50(W1):W115–23.
29. De Bruyn Kops C, Šícho M, Mazzolari A, Kirchmair J. GLORYx: Prediction of the Metabolites Resulting from Phase 1 and Phase 2 Biotransformations of Xenobiotics. Chem Res Toxicol. 15 de fevereiro de 2021;34(2):286–99.

30. Smith AME, Lanevskij K, Sazonovas A, Harris J. Impact of Established and Emerging Software Tools on the Metabolite Identification Landscape. *Frontiers in Toxicology*. 21 de junho de 2022;4.
31. Hemmerich J, Ecker GF. In silico toxicology: From structure–activity relationships towards deep learning and adverse outcome pathways. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 31 de março de 2020;10(4).
32. Foster RS, Fowkes A, Cayley A, Thresher A, Werner ALD, Barber CG, et al. The importance of expert review to clarify ambiguous situations for (Q)SAR predictions under ICH M7. *Genes and Environment*. 22 de setembro de 2020;42(1).
33. Banerjee P, Eckert AO, Schrey AK, Preissner R. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res*. 30 de abril de 2018;46(W1):W257–63.
34. Manganaro A, Chemoinformatics K, Carla G, Politecnico G, Milano D, Benfenati E, et al. VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology. janeiro de 2013; Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287320856>.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS
NÍVEL DOUTORADO

SARAH WINCK DE ALMEIDA

**ESTUDO DA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DA KOMBUCHA, ANÁLISE DE
MICROBIOTA E AVALIAÇÃO DE BENEFÍCIOS PARA À SAÚDE**

PORTO ALEGRE
2021

SARAH WINCK DE ALMEIDA

**KOMBUCHA: ESTUDO DA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO, ANÁLISE DA
MICROBIOTA E DE BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Seixas

Coorientadora: Prof^a Dra. Graziela Brusch Brinques

Porto Alegre

2021

LISTA DE SIGLAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

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

1.1.2 Objetivos Específicos

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

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

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

1.2 Justificativa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

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

2.1 Alimentos e bebidas fermentados

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2 A bebida Kombucha

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

2.2.1 História

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2 Tecnologia de produção, composição físico-química e microbiota

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.2.1 Composição físico-química

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

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

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

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

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

2.2.2.2 Composição da microbiota

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.3 Kombucha e saúde

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 METODOLOGIA

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

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

Quadro 2: Etapas do desenvolvimento da pesquisa

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

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

Fonte: Elaborado pela autora.

3.1. Padronização do cultivo e manutenção do SCOBY

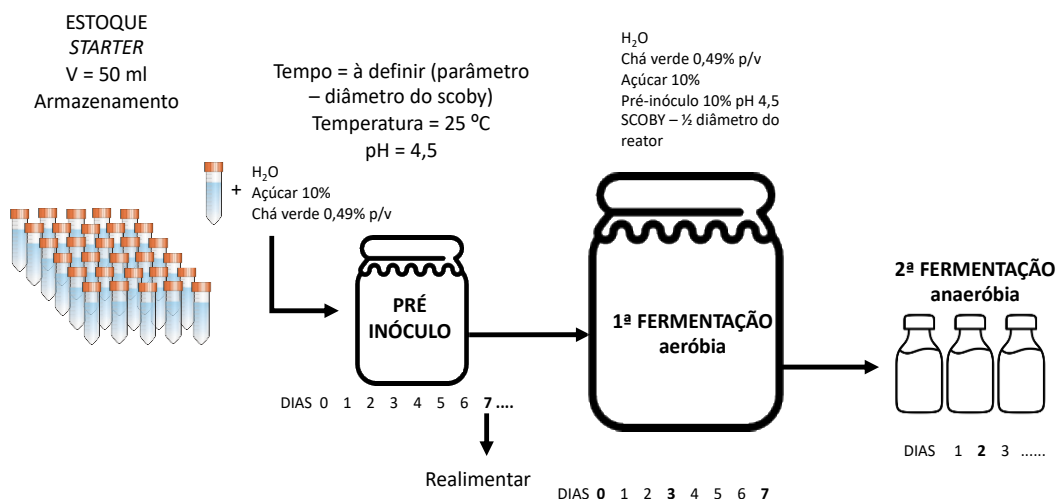
3.1.1. Amostras, armazenamento e manutenção do SCOBY

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

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

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

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



Fonte: Elaborado pela autora.

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

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

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

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

3.2. Caracterização da Microbiota

3.2.1 Preparo das amostras e extração dos ácidos nucleicos

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

3.2.2. Sequenciamento e Análise de dados

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

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

3.2.3. Análise de dados

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

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

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

3.3. Análises físico-químicas

3.3.1 Pré-processamento das amostras

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

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

3.3.2. pH

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

3.3.3. Açúcares

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

3.3.4. Acidez total

A acidez total será analisada segundo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O CO_2 será eliminado utilizando um agitador magnético ou banho de ultrassom. Resumidamente, 10 mL de amostra descarbonatada será transferida para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de água ao qual será adicionado 0,5 mL de indicador fenolftaleína. Será realizada a titulação com hidróxido de sódio 0,1 N padronizado até o aparecimento de coloração rósea persistente na amostra. A acidez total será então expressa em meq/L segundo a equação:

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

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

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

V = volume tomado da amostra, em mL

3.3.5. Acidez volátil

A acidez volátil será determinada segundo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação será realizada por volumetria após a destilação por arraste de vapor. Resumidamente, 10 mL da amostra será colocada em borbulhador junto com 250 mL de água isenta de CO_2 no aparelho gerador de vapor de Cazenave-Ferré (ou conjunto similar de destilação por arraste de vapor). O condensador será conectado. O aparelho de Cazenave-Ferré será aquecido em chapa elétrica até a ebulição com a torneira de vapor aberta, de modo a eliminar o ar do conjunto, bem como, se houver, o gás carbônico da água destilada. Após o início de ebulição, a torneira deverá ser fechada, de modo que o vapor de água borbulhe na amostra arrastando os ácidos voláteis. Será recolhido 100 mL do destilado em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 mL de água destilada. 1 mL de solução de indicador fenolftaleína será adicionada ao destilado e, em seguida, será realizada a titulação com hidróxido de sódio padronizada, até que haja o aparecimento de coloração rósea persistente por 30 s. O cálculo de acidez volátil será realizado utilizando a mesma equação do método de acidez total descrito no item 3.3.4.

3.3.6. Acidez fixa por diferença

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

3.3.7. Ácidos orgânicos

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

3.3.8. Etanol

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

3.3.8.1 Cromatografia Gasosa

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

3.3.8.2 *Alcolyzer Beer*

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

3.3.9. Ésteres

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

3.4. Análises microbiológicas

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

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

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

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

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

3.4.2. Contagem Total de Leveduras (CTL)

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

3.5. Isolamento de Microrganismos

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

3.6. Estudo cinético e otimização do processamento da bebida kombucha

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

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

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

3.6.1. Caracterização da microbiota da bebida kombucha

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

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

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

3.6.3. Caracterização microbiológica da bebida kombucha

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

3.7 Estudo do potencial antioxidante da kombucha *in vitro*

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

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

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

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

3.7.1. Avaliação dos compostos fenólicos presentes na kombucha

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

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

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

3.7.2 Determinação da atividade antioxidante por ABTS

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

3.7.3 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

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

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

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

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

3.7.4 Ensaio antioxidante do poder de redução do ferro - FRAP

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

Os resultados serão calculados a partir da equação:

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

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

O cálculo da atividade antioxidante será realizado pela equação:

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

Onde:

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

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

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

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

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

3.8.1. Cultivo celular

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

3.8.2. Cálculo Amostral

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

3.8.3. Avaliação da viabilidade e proliferação celular

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

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

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

3.8.4. Avaliação de morte e ciclo celular

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

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

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

3.8.5. Ensaio de migração celular

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

3.8.6. Ensaio de formação de colônias (Clonogênico)

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

3.8.7. Ensaio de Wash-out

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

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

3.8.8. Análise estatística

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

3.9. Estudo da atividade antimicrobiana de kombucha

3.9.1. Obtenção do sobrenadante livre de células

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

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

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

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

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

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

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

3.10.1 Viabilidade probiótica e ensaio

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

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

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

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

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

3.10.2 Cálculo e expressão dos resultados

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

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

Sendo:

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

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

3.11. Análise Estatística

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

4 RESULTADOS ESPERADOS

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

Quadro 3: Previsão de publicações

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

Fonte: elaborado pela autora

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

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

Fonte: elaborado pela autora.

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

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

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

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

7 RECURSOS

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

Quadro 4 - Orçamento do Projeto

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

*Despesas custeadas pela pesquisadora

Fonte: Elaborado pelo autor.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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