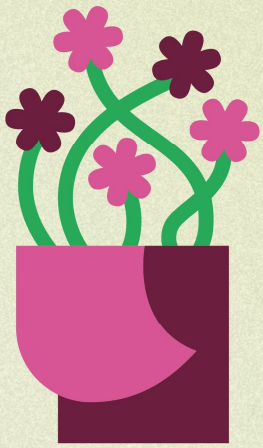
37º CICT
Ciência Delas

Anais

37º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN





37º CICT

Ciência Delas

UFRN PROPESQ CNPq

EXPEDIENTE

APRESENTAÇÃO

O Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica (CICT) é um evento aberto à comunidade no qual todos os aproximadamente 1.800 alunos de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN (bolsistas e voluntários) apresentam os resultados de suas pesquisas desenvolvidas ao longo de um ano, como cumprimento de um plano de trabalho elaborado e orientado por um professor/pesquisador do quadro permanente da Instituição.

O CICT está entre as ações inseridas no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN, que possui entre seus objetivos: a) Contribuir para a formação e engajamento de recursos humanos em atividades de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação; b) Contribuir para a formação científica de recursos humanos que se dedicarão a qualquer atividade profissional; e c) Contribuir para a formação de recursos humanos que se dedicarão ao fortalecimento da capacidade inovadora das empresas no País.

A 37ª edição do Congresso teve como tema “Ciência Delas", estando alinhada aos 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU. Ao submeter os trabalhos ao Congresso, os alunos indicaram os objetivos da Agenda 2030 aos quais suas pesquisas estavam relacionadas. Essa iniciativa visa estimular a pesquisa científica e tecnológica voltada para a busca por soluções para os desafios sociais contemporâneos. Em uma etapa inicial do CICT, denominada Mostra de Trabalhos e Vídeos de Ciência, Tecnologia e Inovação, foram realizadas as apresentações dos trabalhos submetidos pelos participantes do evento. As apresentações ocorreram de forma assíncrona, por meio de arquivos digitais (trabalho completo e vídeo), sendo disponibilizadas não só aos avaliadores do congresso pelos Sistemas da UFRN, mas também ao público em geral por meio do site do evento (www.cic.propesq.ufrn.br). Após essa etapa inicial, que ocorreu sob o formato virtual, os 48 melhores trabalhos do evento foram selecionados para apresentação oral em uma etapa complementar do congresso que ocorreu de forma presencial.

Os alunos concorreram ao 10º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN, que foi instituído pela Pró-Reitoria de Pesquisa em 2017 para reforçar as ações dos programas institucionais de iniciação científica e tecnológica. O prêmio contemplou as categorias Trabalho Destaque de Iniciação Científica e Tecnológica e Vídeo Destaque de Iniciação Científica e Tecnológica e na subcategoria de Inovação. Os premiados foram agraciados com bolsas mensais de até R$ 1100,00 (mil e cem reais) durante o período de um ano. Os orientadores dos alunos premiados adquiriram precedência em relação aos demais para efeitos de concorrência no Edital de Bolsas de Pesquisa da UFRN em 2027.

Ainda em 2026, a Pró-Reitoria de Pesquisa realizou a 8ª Edição do Prêmio Pesquisador Destaque da UFRN, certame instituído em 2019 e que é concedido anualmente aos pesquisadores da instituição que tenham apresentado relevantes contribuições para o desenvolvimento da ciência em cada uma das três grandes áreas do conhecimento: Ciências da Vida; Ciências Exatas, da Terra e Engenharias; e Ciências Humanas e Sociais, Letras e Artes. Além de troféu e certificado, todos os premiados foram contemplados com auxílio no valor de R$ 10.000,00 (dez mil reais) para custear despesas específicas, discriminadas em edital, e tiveram a oportunidade de compartilhar suas experiências com os participantes do CICT 2026 em uma mesa redonda.

Além de valorizar a contribuição das mulheres para a produção do conhecimento científico, promovendo a visibilidade de suas trajetórias e reconhecendo seu papel no desenvolvimento da ciência, o congresso cumpriu três funções valiosas para a instituição: a inserção dos discentes em um ambiente acadêmico de publicação e apresentação dos resultados de pesquisa; a divulgação científica, por meio de vídeos que utilizam uma linguagem científica, porém acessível ao público em geral; e, por fim, a popularização da ciência.

PROGRAMAÇÃO

DATA	ATIVIDADE
09/10	Divulgação da lista dos pré-selecionados para concorrer ao 9º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN
19/10	Abertura oficial do evento
19/10 a 23/10	CICT 2026 - Etapa presencial
20/10 a 22/10	Sessões de apresentações orais
23/10	Cerimônia de premiação e encerramento do evento

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

CÓDIGO: ET0597

AUTOR: SAVIO LAIR CAVALCANTE SILVEIRA

ORIENTADOR: GILBERTO CORSO

TÍTULO: Fotoidentificação de odontocetos na Zona Econômica Exclusiva Brasileira

Resumo

A fotoidentificação de cetáceos é uma ferramenta eficiente e amplamente utilizada para obtenção de informações ecológicas sobre esses animais. Essa técnica pode ser empregada a partir de plataformas em terra ou no mar e é considerada não invasiva, simples e de baixo custo. No grupo dos odontocetos, é possível identificar os indivíduos utilizando principalmente características nas nadadeiras dorsais, como marcas e escoriações. A baleia-piloto-de-peitoral-curta (Globicephala macrorhynchus) é uma espécie de odontoceto encontrada em todos os oceanos tropicais e temperados, sendo portanto, também registrada no Brasil. Este estudo proporcionou o uso da técnica de fotoidentificação num evento de encalhe em massa de um grupo de G. macrorhynchus no litoral norte do Rio Grande do Norte. Através da plataforma Flukebook, foi possível utilizar a fotoidentificação associada à inteligência artificial para catalogar/identificar indivíduos de G. macrorhynchus registrados durante esse evento de encalhe. Em campo, foi observado a presença de 21 indivíduos e obtidas 552 fotografias. Essas imagens foram analisadas e classificadas em níveis de qualidade e distintividade das marcas nas nadadeiras dorsais dos indivíduos. A partir dessas imagens iniciais foram escolhidas 80 imagens para serem submetidas ao programa de reconhecimento de imagem (MiewID) e posteriormente validadas de forma manual, combinando a automação da inteligência artificial com a supervisão humana.

Palavras-chave: Fotoidentificação; Globicephala macrorhynchus; Flukebook; MiewID.

TITLE: Photo-identification of odontocetes in the Brazilian Exclusive Economic Zone

Abstract

Cetacean photo-identification is an efficient and widely used tool for obtaining ecological information about these animals. This technique can be conducted from land- or sea-based platforms and is considered non-invasive, simple, and cost-effective. In

odontocetes, individuals can be identified mainly based on distinctive characteristics of the dorsal fins, such as scars and markings. The short-finned pilot whale (Globicephala macrorhynchus) is an odontocete species found throughout tropical and temperate oceans and is therefore also recorded along the Brazilian coast. This study applied the photo-identification technique during a mass stranding event involving a group of G. macrorhynchus on the northern coast of Rio Grande do Norte, Brazil. Using the Flukebook platform, photo-identification was combined with artificial intelligence to catalog and identify G. macrorhynchus individuals recorded during the stranding event. A total of 21 individuals were observed in the field, and 552 photographs were obtained. The images were analyzed and classified according to the quality and distinctiveness of the markings on the individuals' dorsal fins. Based on the initial set of images, 80 photographs were selected for submission to the image recognition program MiewID and subsequently manually validated, combining artificial intelligence-based automation with human supervision.

Keywords: Photo-identification; Globicephala macrorhynchus; Flukebook; MiewID.

Introdução

A técnica de fotoidentificação é uma ferramenta não invasiva, de baixo custo e alta eficiência para o monitoramento de populações de cetáceos (Martins, 2022). Por meio da análise de marcas naturais e características morfológicas individuais é possível reconhecer e acompanhar os mesmos indivíduos ao longo do tempo. Em odontocetos, grupo-alvo deste estudo, em específico na baleia-piloto-de-peitoral-curta (Globicephala macrorhynchus), marcas individuais que diferenciam os indivíduos podem ser encontradas nas nadadeiras dorsais dos animais. Diferentemente das técnicas de marcações artificiais onde o animal é capturado fisicamente e recebe uma etiqueta de identificação e rastreio, a técnica de usar marcas naturais do animal como critério de identificação é um método menos invasivo e estressante para o animal e de baixo custo tendo em vista que não há a necessidade de captura. Durante a observação e a captura de imagens, o alvo de registro são marcas duradouras nos indivíduos, como cicatrizes, padrões de pigmentação, cortes e contornos na nadadeira dorsal. Entretanto, essas características podem ser difíceis de fotografar devido à natureza de deslocamento livre e muitas vezes não direcional apresentada pelos odontocetos. Além disso, o fato de se estabelecerem em grupos torna mais desafiador a obtenção de imagens de dorsais de todos os indivíduos (Trotter et al., 2022). Apesar dos desafios, a técnica de fotoidentificação pode ser usada para acessar dados ecológicos relevantes, como por exemplo: padrões de residência, fidelidade de área, estrutura populacional e sazonalidade das populações no espaço e no tempo (Silva, 2021; Silva, 2024).

A baleia-piloto-de-peitorais-curtas é um odontoceto oceânica com hábitos alimentares influenciados principalmente pela disponibilidade de presas e pela temperatura da água (Riou et al., 2024). Essa espécie forma grupos sociais grandes podendo atingir centenas de indivíduos, naturalmente obedecendo à uma estrutura hierárquica matrilinear, sendo isso um fator potencializador de encalhes devido à essa coesão muito bem estabelecida (Riou et al., 2024). A G. macrorhynchus é conhecida por ser uma espécie altamente sociável com uma ampla distribuição em oceanos tropicais e temperados do globo. É estimado uma abundância global de aproximadamente 700,000 indivíduos, porém,

grandes áreas de distribuição dessa espécie não foram estudadas, portanto, é esperado que a abundância real seja maior que isso (Minton et al., 2018). Essa espécie foi avaliada mais recentemente na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (International Union for the Conservation of Nature) em 2018, sendo classificada como de menor preocupação (IUCN, 2018). Por sua distribuição cosmopolita, ela parece ser relativamente abundante em quase todas as partes do seu alcance, e não há ameaças consideradas significantes, exceto nas águas próximas ao Japão tendo em vista a caça e exploração dessa espécie por séculos nesta região (Minton et al., 2018).

Os dados utilizados neste trabalho são provenientes de um evento de encalhe de G. macrorhynchus ocorrido no litoral norte do Rio Grande do Norte. Os indivíduos em situação de encalhe apresentavam deslocamento lento e paralelo à costa na porção rasa e a maioria não chegou a efetivamente encalhar na praia. Assim, o objetivo deste estudo foi empregar a técnica de fotoidentificação nos indivíduos fotografados durante esse evento de encalhe em massa de baleias-piloto-de-peitoral-curta.

Metodologia

Os dados obtidos para a realização deste estudo foram obtidos durante um evento de encalhe de um grupo de 21 indivíduos de G. macrorhynchus ocorrido no período de 31 de maio a 2 de junho de 2024, na praia de Pititinga, município de Rio do Fogo, litoral norte do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. As fotografias foram tiradas da faixa de praia com a distância aproximada de 200 metros dos indivíduos encalhados ao longo do último dia da duração do encalhe. O equipamento utilizado para o registro foi uma câmera modelo Canon EOS 7D e uma lente com 500mm de distância focal.
A metodologia para análise dos dados foi dividida em três partes: (1) organização das fotos em HD externo, triagem inicial das fotos e seleção com base em duas características principais: distintividade e qualidade; (2) submissão das fotos triadas e selecionadas na plataforma Flukebook e execução do principal algoritmo de análise e identificação de cetáceos em cada fotografia e (3) supervisão do resultado da análise automática do software verificando manualmente a identificação dos indivíduos.
Todas as fotos obtidas em campo foram armazenadas em um HD externo totalizando 1104 arquivos. Entretanto, tendo em vista que o modelo de câmera usado captura dois formatos distintos da mesma foto, o total de fotos obtidas foi de 552 (formato JPG). A partir dessa triagem inicial, as fotos foram classificadas com base em dois fatores principais para identificação: distintividade e qualidade. A distintividade é a categoria que se sustenta na individualidade e nas marcas únicas dos animais fotografados (Urian et al., 2015). Nesse caso, as marcas de identificação devem ser distintas o bastante para sustentar a diferenciação do indivíduo. Já a qualidade se refere diretamente às propriedades da imagem capturada. A utilização de imagens de baixa qualidade aumentam o risco de realizar combinações incorretas ao utilizar o software, gerar falsos positivos (combinar dois animais diferentes como um único indivíduo), gerar falsos negativos (combinar um animal como dois ou mais indivíduos diferentes) e formar uma estimativa enviesada pautada pelo erro (Urian et al., 2015). Dessa forma, as imagens foram selecionadas levando em consideração luminosidade, foco (especificamente no animal-alvo) e quantidade de pixels, ou seja, full HD (1920 x 1080).

Para este estudo, foi estabelecido um limiar de classificação de distintividade e

qualidade de 1 a 4 níveis. Sendo 1 o nível mais baixo, em que a nadadeira dorsal fotografada não apresenta nenhuma característica que possa distinguir o indivíduo ou a qualidade da imagem é extremamente baixa; 2, pouca informação relacionada aos padrões do indivíduos ou a qualidade da imagem possuindo um dos três fatores supracitados; 3, moderada informação que distingue o animal como uma clara observação da nadadeira dorsal ou a qualidade da imagem atinja dois dos três critérios; e 4, vários fatores de identificação do indivíduo e/ou a qualidade de imagem atinge todos os critérios considerados (Urian et al., 2015).

Após a triagem e categorização das fotos foi gerado uma planilha com as informações de qualidade da imagem e distintividade das marcas individuais de cada nadadeira dorsal encontrada (Figura 1). As fotos classificadas com qualidade e distintividade > 2 em ambas as categorias, de acordo com os níveis pré-estabelecidos, foram selecionadas e separadas manualmente em um novo arquivo de 435 MB, respeitando o limite imposto pelas recomendações do programa de até 100 imagens por upload. Após foi gerada uma outra planilha referente apenas a essas imagens que foi carregada na plataforma Flukebook juntamente com as imagens para serem submetidas ao algoritmo de identificação (Figura 2). A planilha inserida na plataforma precisa fornecer informações escritas de acordo com a forma que o programa consegue ler, tais como código da imagem (Encouter.media.Asset0) e região do país em que as imagens foram captadas (Encounter.location.ID), além de todas as informações já estabelecidas com a diferença de nomenclatura (Figura 2). Ao serem importadas e submetidas no Flukebook, toda e cada imagem se torna um “encontro”. Esses encontros se referem somente ao arquivo de imagem e dentro desses “encontros” cada indivíduo identificado é referido como “avistagem”, portanto, ao importar 80 imagens, gera-se 80 encontros.
O Flukebook é uma plataforma online onde pesquisadores monitoram e identificam cetáceos através de registros fotográficos de indivíduos estudados. Após o upload de imagens na plataforma é possível aplicar algoritmos de visão computacional para rastrear e identificar individualmente baleias e golfinhos. Para este estudo, foi utilizado a interface “Matching and Interpreting Embeddings for Wildlife ID (MiewID)”, um modelo de inteligência artificial usado para identificar indivíduos, tanto para animais marinhos como animais terrestres (Otarashvili et al., 2024). O MiewID consegue aprender padrões que estabeleçam similaridade ou diferença ao comparar fotografias pelas características dos animais como nadadeiras dorsais e caudais, marcas de duração longa como cortes, arranhões e manchas. Além disso, esse algoritmo aprende através do importe de imagens, ou seja, é preciso um catálogo previamente estabelecido de indivíduos para a combinação ser efetuada, mas também, o treinamento desse algoritmo necessita de marcação manual das dorsais de cada indivíduo nas imagens a serem analisadas, para que assim, o algoritmo efetue a identificação e distinção dos animais (Otarashvili et al., 2024).
Para constituir a base de imagens para o algoritmo atuar, foram selecionadas 80 imagens do banco de dados inicial triado e organizadas em uma planilha de acordo com os critérios estabelecidos (Tabela 1). Essas fotos foram catalogadas em uma nova planilha de acordo com as informações necessárias para o reconhecimento do MiewID (País, coordenadas, ano, mês, dia, hora, minuto, gênero, espécie e código local da região.

Resultados e Discussões

O registro fotográfico de indivíduos de Globicephala macrorhynchus forneceu 552 imagens em um dia de atividades de campo. A partir desse conjunto inicial de fotografias, 80 foram selecionadas levando em consideração dois critérios principais: qualidade da imagem e distintividade dos indivíduos presentes nas fotos. Submetidas na plataforma Flukebook, cada foi nomeada como encontros e gerado um boletim para a aplicação do algoritmo em cada imagem de forma manual. O MiewID analisou cada imagem comparando-as com as demais para a identificação de cada indivíduo de modo que o pesquisador analista conseguiu marcar os animais com códigos únicos e assim estabelecer uma lista de indivíduos presentes nesse evento de encalhe. Pela observação presencial no evento, foi possível contabilizar 21 animais, porém, com as imagens, o algoritmo distinguiu 19, obtendo uma percentagem de aproximadamente 90% de reconhecimento.

A porcentagem alcançada pelo programa de identificação apresenta a eficiência do MiewID quando submetidas imagens de alta qualidade com indivíduos marcados com características bem distinguíveis. Porém, essa margem de falha que se atribui aos 3 indivíduos não identificados pode significar a falta de registro fotográfico deles; erro do algoritmo ao identificar os indivíduos seja por admitir 2 ou mais indivíduos como um só; indivíduos sem marcas expressivas que garantem individualidade, principalmente em indivíduos filhotes ou juvenis; e/ou a classificação da imagem, na etapa inicial, não foi suficientemente clara para o reconhecimento do programa de computador. Assim, essa técnica de monitoramento e identificação associada à uma interface de inteligência artificial se mostra como uma ferramenta eficiente para o registro de animais, combinando a automação com a validação manual, entretanto, não descarta a necessidade de uma avaliação humana treinada.

Conclusão

Este projeto buscou utilizar a técnica de fotoidentificação associada a uma inteligência artificial para catalogar e registrar um grupo de indivíduos de baleia-piloto-de-peitoral-curta num evento de encalhe em massa no litoral norte do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A plataforma Flukebook foi base essencial para o armazenamento e transporte de dados, bem como necessário para a utilização do algoritmo de identificação de imagens. Essa abordagem não invasiva possibilitou avaliar o desempenho desse software quanto a submissão de imagens e treinamento de reconhecimento de uma interface artificial para com características físicas desses cetáceos.

Essa técnica, embora eficaz, encontra potenciais falhas quando o banco de fotos de nadadeiras dorsais é limitado, por exemplo, animais que foram fotografados em um único encontro. Além disso, as fotos precisam ser selecionadas utilizando um filtro de qualidade, tornando o total de submetidas ao algoritmo menor do que o total de fotos tiradas durante um encontro. Dessa forma, para aplicação desse método deve-se priorizar imagens de alta qualidade e com indivíduos marcados com características individuais. Por isso, a partir deste trabalho, deverá ser considerado ampliar o número de fotografias com melhores qualidades possíveis; ampliar o banco de dados de nadadeiras dorsais de indivíduos de G. macrorhynchus por meio de novos encontros;

realizar novos registros em diferentes períodos e localidades; comparar indivíduos entre diferentes eventos; acompanhar a ocorrência desses mesmos indivíduos ao longo do tempo e em outras possíveis regiões; e por fim, integrar esses dados a outros dados ecológicos. Nesse sentido, este estudo pôde explorar o método de fotoidentificação num evento com indivíduos de odontocetos de modo a registrar dados visuais para ampliar o conhecimento dessa espécie para a possibilidade de estudos futuros.

Referências

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2023-1. 2023. Disponível em: https://www.iucnredlist.org. Acesso em: 23 ago. 2026.

MARTINS, Gabriela Ventura. A foto-identificação como ferramenta de avaliação de populações do boto-cinza (Sotalia guianensis) (Van Bénèden, 1864): elaboração de catálogo para o litoral norte de São Paulo e comparação com áreas adjacentes. 2022. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2022.

MINTON, G.; BRAULIK, G.; REEVES, R. Globicephala macrorhynchus. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T9249A50355227. 2018. DOI: https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T9249A50355227.en.

OTARASHVILI, Lasha; SUBRAMANIAN, Tamilselvan; HOLMBERG, Jason; LEVENSON, J. J.; STEWART, Charles V. Multispecies animal re-ID using a large community-curated dataset. arXiv, 2024. DOI: https://doi.org/10.48550/arXiv.2412.05602.

RIOU, Manon; FRERIKS, Claire; ORTOLÉ, Célia; VALIN, Céline; SAFI, Morjane; COCKX, Eric; MILLON, Cédric; BOUVERET, Laurent; DE MONTGOLFIER, Benjamin. Site fidelity and population parameters of short-finned pilot whales (Globicephala macrorhynchus) in the Eastern Caribbean through photographic identification. Latin American Journal of Aquatic Mammals, v. 19, n. 2, p. 165-181, 2024. DOI: https://doi.org/10.5597/lajam00336.

SILVA, Gessica Rafaelly Dantas da. Fidelidade de habitat e residência de botos-cinza (Sotalia guianensis) em uma área marinha protegida no Nordeste do Brasil. 2021. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2021.

SILVA, Ísis Viviane Bezerra da. Fotoidentificação na Plataforma Flukebook revela aspectos da biologia comportamental de Sotalia guianensis no Rio Grande do Norte e Paraíba. 2024. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2024.

TROTTER, Cameron; WRIGHT, Nick; MCGOUGH, A. Stephen; SHARPE, Matt; CHENEY, Barbara; ARSO CIVIL, Mònica; MOORE, Reny Tyson; ALLEN, Jason; BERGGREN, Per. Towards automatic cetacean photo-identification: a framework for fine-grain, few-shot learning in marine ecology. In: TSUMOTO, Shusako; OHSAWA, Yukio; CHEN, Lei; VAN DEN POEL, Dirk; HU, Xiaohua; MOTOMURA, Yoichi; TAKAGI, Takuya; WU, Lingfei; XIE, Ying; ABE, Akihiro; RAGHAVAN, Vijay (eds.). Proceedings of the 2022 IEEE International Conference on Big Data. New York: IEEE, 2022. p. 1942-1949. DOI: https://doi.org/10.1109/BigData55660.2022.10020942.

URIAN, Kim; GORGONE, Antoinette; READ, Andrew J.; BALMER, Brian; WELLS, Randall S.; BERGGREN, Per; DURBAN, John W.; EGUCHI, Tomo; RAYMENT, William; HAMMOND, Philip S. Recommendations for photo-identification methods used in capture-recapture models with cetaceans. Marine Mammal Science, v. 31, n. 1, p. 298-321, 2015. DOI: https://doi.org/10.1111/mms.12141.

Anexos

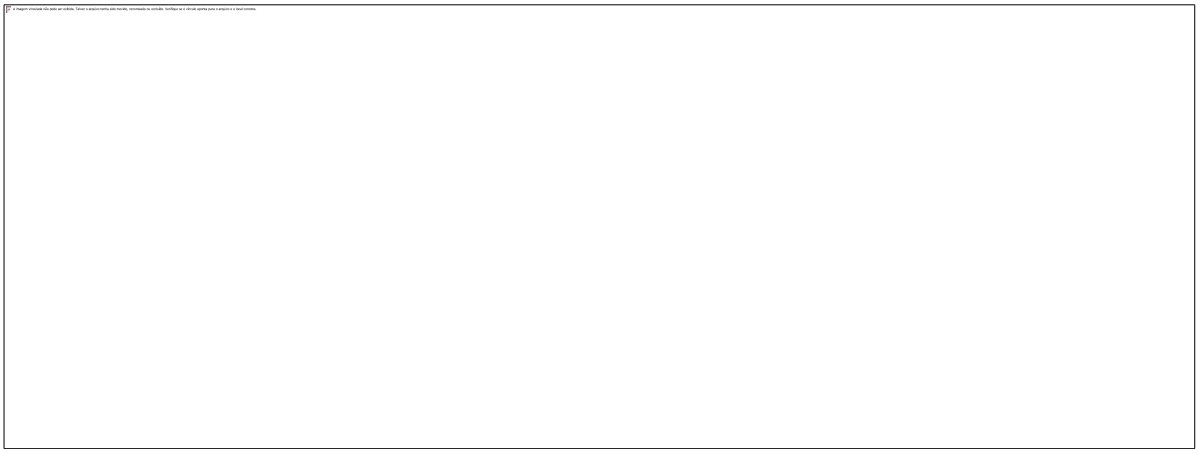


Figura 1

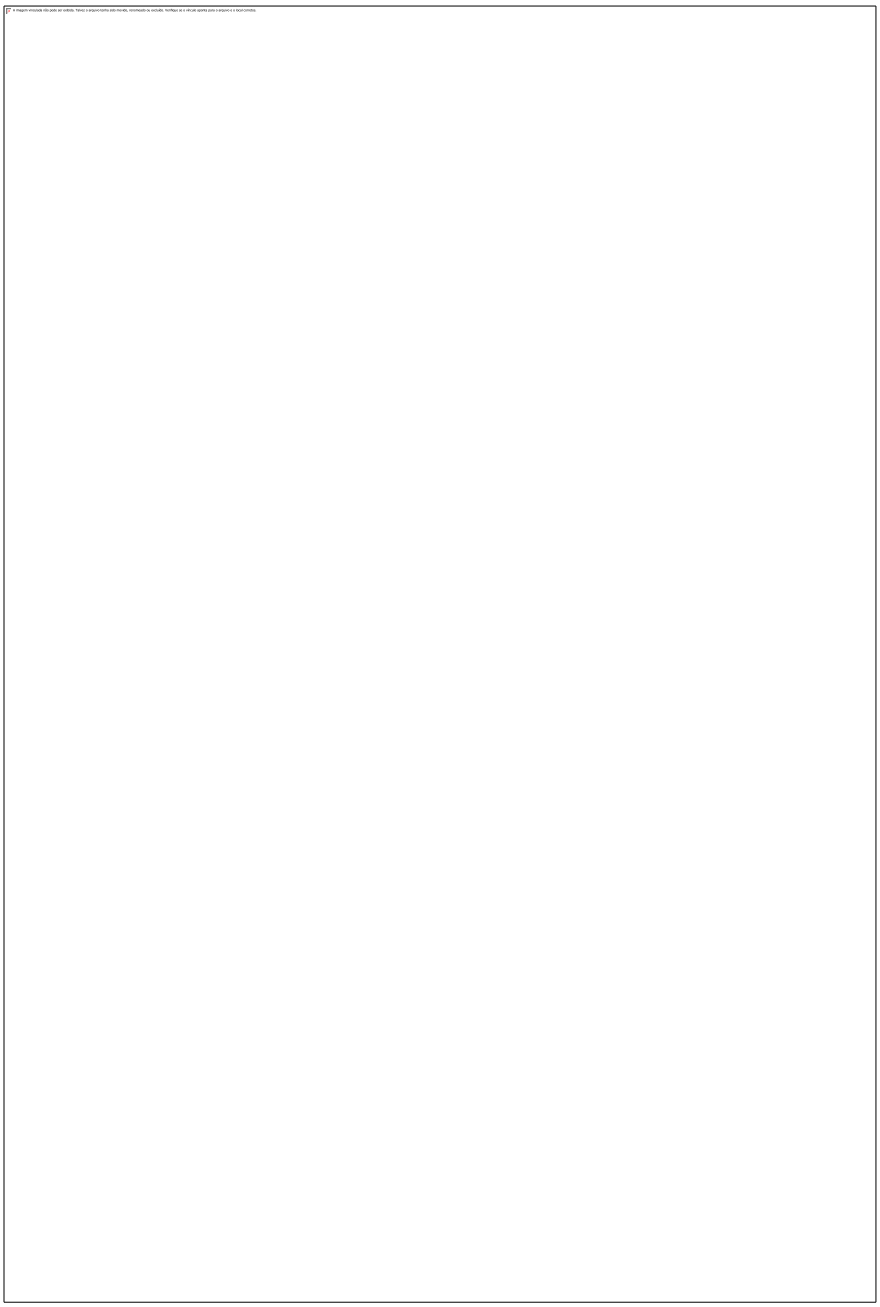


Figura 2

CÓDIGO: ET0677

AUTOR: THAINÁ RIBEIRO DE MEDEIROS

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: Avaliação da temporalidade do filme de plasma atmosférico frio em superfícies metálicas para aplicação biomédica.

Resumo

A fixação da bactéria Pseudomonas aeruginosa em implantes metálicos e a formação de biofilmes são problemas relevantes na odontologia e ortopedia, podendo causar infecções e perda do implante. O Plasma Atmosférico a Frio (CAP) é uma alternativa para a desinfecção desses materiais, porém seus efeitos sobre o desenvolvimento bacteriano ao longo do tempo ainda precisam ser compreendidos. Este trabalho avaliou os efeitos do plasma sobre a adesão, morfologia e desprendimento de P. aeruginosa em discos de titânio durante 120 horas. As amostras foram divididas em grupo controle (lixado e polido) e grupo tratado com plasma, analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 28, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo. Embora a adesão inicial tenha ocorrido em ambos os grupos, as bactérias tratadas apresentaram deformações e danos na parede celular nas primeiras 28 e 48 horas. Em 72 horas, o controle apresentou biofilme maduro e aderido, enquanto o grupo tratado mostrou bactérias dispersas, desorganizadas e restos celulares. Em 96 e 120 horas, houve desprendimento bacteriano em ambos os grupos, mas os danos e resíduos celulares permaneceram no grupo tratado. Os resultados indicam que o CAP dificulta a organização e manutenção do biofilme, mostrando-se uma alternativa promissora para a descontaminação de implantes de titânio.

Palavras-chave: Plasma frio; Titânio; Bactérias; Biofilmes; Tempo de cultivo.

TITLE: Assessment of the Temporality of Cold Atmospheric Plasma Film on Metallic Surfaces for Biomedical Applications

Abstract

The adhesion of Pseudomonas aeruginosa to metallic implants and biofilm formation are relevant problems in dentistry and orthopedics, potentially causing infections and implant failure. Cold Atmospheric Plasma (CAP) is an alternative for disinfecting these materials; however, its effects on bacterial development over time remain to be fully understood. This study evaluated the effects of plasma treatment on the adhesion, morphology, and detachment of P. aeruginosa on titanium discs over 120 hours. Samples were divided into a control group (sanded and polished) and a plasma-treated

group, and analyzed by scanning electron microscopy (SEM) after 28, 48, 72, 96, and 120 hours of culture. Although initial adhesion occurred in both groups, plasma-treated bacteria showed deformation and cell wall damage at 28 and 48 hours. At 72 hours, the control group presented a mature and strongly adhered biofilm, whereas the treated group showed dispersed and disorganized bacteria and cellular debris. At 96 and 120 hours, bacterial detachment occurred in both groups, but cellular damage and debris persisted in the treated group. These results indicate that CAP hinders biofilm organization and maintenance, demonstrating its potential as an alternative for the decontamination of titanium implants.

Keywords: Cold plasma; Titanium; Bacteria; Biofilms; Culture time.

Introdução

A bactéria Pseudomonas aeruginosa chama atenção pela sua notável versatilidade genômica e adaptabilidade, o que permite sua sobrevivência em múltiplos ecossistemas, incluindo superfícies clínicas e biomateriais (AMBREETHA et al., 2024). Em condições normais, a microbiota bucal mantém-se em equilíbrio; no entanto, alterações imunológicas ou estresses ambientais podem desestabilizar essa barreira e favorecer o surgimento de infecções oportunistas graves (GERMANO et al., 2018).

Na odontologia, a presença desse patógeno é um desafio crítico, sobretudo em ambiente de terapia intensiva. Em pacientes sob cuidados na UTI, a higiene bucal precária e a consequente alteração da microbiota facilitam a colonização da cavidade oral por bacilos Gram-negativos (SILVA et al., 2025). Sob essa condição, a placa dental interage com patógenos oportunistas e passa a atuar como porta de entrada para infecções respiratórias severas (OLIVEIRA, 2024). Além disso, a proliferação bacteriana em biofilmes estruturados e a colonização assistida por dispositivos de ventilação aumentam significativamente o risco de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (SOUZA et al., 2022).

Essa facilidade de fixação se estende ao mundo dos implantes. O titânio, embora amplamente utilizado por sua biocompatibilidade e resistência mecânica, não possui defesas biológicas naturais contra a adesão bacteriana (MARTINS, 2022). Uma vez consolidado o biofilme sobre o metal, o processo infeccioso pode desencadear reações inflamatórias graves nos tecidos adjacentes, como a peri-implantite, resultando em perda óssea e na eventual perda do implante (MARTINS, 2022).

Para combater essa colonização sem induzir resistência antimicrobiana, o Plasma Atmosférico a Frio (CAP) surge como alternativa promissora. O CAP gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) e radiação ultravioleta que rompem o envelope bacteriano, oxidam proteínas e danificam o DNA, inativando o biofilme de forma rápida (MARTINS, 2022; ZHAN et al., 2024). Portátil e operando sob temperatura ambiente, essa tecnologia apresenta grande viabilidade prática para a desinfecção de implantes de titânio antes de sua fixação cirúrgica (MARTINS, 2022).

Metodologia

Caracterização da superfície das amostras

As amostras foram analisadas quanto a rugosidade em alta resolução pelo AFM (ParkSystems NX10), enquanto a composição química foi realizada por meio do AFM-Infravermelho, ambos presentes no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Engenharia de Materiais (CNPEM). Além disso, a emissão óptica foi captada e enviada para e Espectrômetros (USB Ocean Optics Spectrasuite), a fim de verificar as espécies produzidas (Vitoriano et al., 2022). Os espectros obtidos foram analisados quanto à intensidade relativa das espécies e dos picos gerados analisados conforme o valor de referência do banco de dados de transição atômica National Institute of Standards and Technology – NIST.

Cultura de cepas bacterianas

O preparo da cultura bacteriana foi realizado utilizando cepas de Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853). As cepas foram cultivadas aerobiamente em meio sólido Brain Heart Infusion Broth (BHI, KASVI), a 37 °C em estufa bacteriológica, em 24 horas para formação das colônias. Após a formação das colônias, foi coletada uma colônia bacteriana e diluída em solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, até atingir uma absorbância entre 0,08 e 0,10, aferida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm.

Incubação das bactérias sobre os discos

Os discos foram acondicionados em placas de 24 poços, sendo adicionados 50 µL da suspensão bacteriana sobre suas superfícies. As placas foram incubadas por 90 minutos a 37 °C, em condições aeróbicas, em estufa. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa, a suspensão bacteriana foi removida e os discos foram enxaguados com solução tampão fosfato (PBS). Em seguida, os discos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em PBS (pH 7,2).

Análise Morfológica – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As células analisadas aqui são as que obtiveram melhor durabilidade do filme depositado. Essas células foram cultivadas sobre as superfícies por 4 horas para análise morfológica. Posteriormente, os discos foram enxaguados com solução tampão fosfato (PBS) e fixados com 2,5% de glutaraldeído em PBS (pH 7,2), seguidos de pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão. Em sequência, as amostras foram desidratadas por meio de uma série crescente de concentrações de etanol e, então, metalizadas com ouro (Q Plus Series, Quorum Technologies Ltd, Laughton, England). Por fim, as imagens foram capturadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan).

Análises Estatísticas

Os experimentos serão realizados em replicata para cada superfície e os resultados submetidos a análise estatística. O teste One-Way ANOVA seguido de teste de

múltiplas comparações será aplicado para a caracterização da amostra. Todos os testes terão significância $p<0.05$.

Resultados e Discussões

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram diferenças claras no padrão de colonização bacteriana e na integridade física das células entre o grupo controle e as superfícies tratadas com plasma (Ti-CAP) ao longo de 120 horas de monitoramento. Nos períodos iniciais de 28 e 48 horas, foi possível notar o início da fixação das bactérias em ambos os grupos, o que caracteriza a fase de adesão reversível, correspondente ao primeiro estágio de desenvolvimento do biofilme (ZHAN et al., 2024). No grupo controle, as bactérias mantiveram contornos bem definidos, estrutura preservada e morfologia saudável. Em contraste, as amostras tratadas com CAP apresentavam deformações físicas evidentes e enfraquecimento visível da parede celular. Esse dano precoce está associado à ação multifatorial do plasma, que provoca oxidação proteica, lesões físicas no envelope bacteriano e quebras no material genético decorrentes da radiação ultravioleta e do estresse oxidativo agudo (MARTINS, 2022; ZHAN et al., 2024).

No período de 72 horas, que representa o pico de colonização bacteriana, a organização espacial das células mudou drasticamente entre as amostras. No grupo controle, o biofilme já estava maduro e consolidado de forma compacta. Já no grupo Ti-CAP, as bactérias se agrupavam de maneira dispersa e pouco compactada, cercadas por um acúmulo contínuo de resíduos celulares (debris). Essa tentativa de colonização na superfície tratada indica uma resposta de resistência adaptativa coordenada pelo sistema Wsp (O'NEAL et al., 2022). Nesse mecanismo, o estresse provocado pelo plasma no envelope celular, exacerbado pela ação oxidativa nos períodos iniciais, é detectado pela proteína sensora WspA. Isso desencadeia uma cascata de sinalização que ativa a WspR e eleva os níveis intracelulares de c-di-GMP, um sinalizador mestre que estimula a produção da matriz extracelular na tentativa de blindar a colônia (O'NEAL et al., 2022; ZHAN et al., 2024). Porém, a presença contínua de deformações e debris celulares às 72 horas mostra que o estresse gerado pelo plasma superou a capacidade de defesa antioxidante bacteriana.

Nas etapas finais de 96 e 120 horas, observou-se um declínio populacional acentuado em ambos os grupos, restando apenas algumas bactérias isoladas ao término do experimento. Essa redução expressiva coincide com a fase de dispersão ativa, o último estágio do ciclo de vida do biofilme (PETROVA; SAUER, 2016). Segundo o modelo de Petrova e Sauer (2016), quando as condições de permanência na superfície se tornam desfavoráveis devido à escassez de nutrientes e ao acúmulo de resíduos metabólicos, as bactérias reduzem os níveis intracelulares de c-di-GMP. Esse sinal induz a liquefação interna das microcolônias e o rompimento da matriz por meio de enzimas degradadoras, permitindo que os microrganismos recuperem a motilidade e retornem ao estado livre (planctônico) para buscar novos nichos. Embora esse ciclo de escape tenha ocorrido em ambos os grupos, o histórico de danos severos e a desorganização espacial contínua no grupo Ti-CAP confirmam que o tratamento com plasma impediu que a Pseudomonas aeruginosa estabelecesse uma colonização estável ou duradoura sobre o titânio.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que o Plasma Atmosférico a Frio (CAP) altera significativamente a dinâmica de colonização e a integridade física de Pseudomonas aeruginosa em superfícies de titânio. O tratamento provocou danos celulares graves e impediu a estruturação de um biofilme compacto, superando inclusive as defesas adaptativas da bactéria coordenadas pelo sistema Wsp. O monitoramento temporal revelou que a comunidade bacteriana permaneceu instável desde as primeiras horas de adesão até o processo final de dispersão. Esses achados confirmam o potencial do CAP como uma tecnologia prática, portátil e altamente eficaz para a desinfecção de implantes metálicos, contribuindo diretamente para reduzir os riscos de infecções clínicas precoces.

Referências

AMBREETHA, Sakthivel; ZINCKE, Diansy; BALACHANDAR, Dananjeyan; MATHEE, Kalai. Genomic and metabolic versatility of Pseudomonas aeruginosa contributes to its inter-kingdom transmission and survival. Journal of Medical Microbiology, London, v. 73, n. 2, e001791, 2024. DOI: 10.1099/jmm.0.001791.

GERMANO, et al. Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura. Revista Nova Esperança, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 91-99, 2018. DOI: 10.17695/issn.2317-7160.v16n2a2018p91-99.

MARTINS, Gabriel de Moura. Investigação in vitro da hemocompatibilidade e redução bacteriana em superfícies de titânio tratado por plasma. 2022. 47 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2022.

O'NEAL, L.; BARAQUET, C.; SUO, Z.; DREIFUS, J. E.; PENG, Y.; RAIVIO, T. L.; WOZNIAK, D. J.; HARWOOD, C. S.; PARSEK, M. R. The Wsp system of Pseudomonas aeruginosa links surface sensing and cell envelope stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), Washington, v. 119, n. 18, e2117633119, 2022. DOI: 10.1073/pnas.2117633119.

OLIVEIRA, T. R. R. G. Odontologia hospitalar e sua importância. Revista CPAQV - Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 1-11, 2024. DOI: 10.36692/V16N3-52R.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. Current Opinion in Microbiology, London, v. 30, p. 49-57, 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.01.001.

SILVA, Marcos Eduardo Passos da; SUICA, Luccas Manoel de Melo; RODRIGUES, Renata Santos; RAMOS, Izabelly Vitória Gotara; CARVALHO, Anjo Gabriel; LIMA, Nucia Cristiane da Silva; BELÉM, Mayra Gyovana Leite; ESQUERDO, Rosimar Pires; MATOS, Najla Benevides. Oral cavity colonization by Pseudomonas aeruginosa in patients admitted in the intensive care units (ICUs). Brazilian Journal of Oral Sciences, Piracicaba, v. 24, e257686, 2025. DOI: 10.20396/bjos.v24i00.8677686.

SOUZA, S. C. C. et al. Qual a importância da odontologia hospitalar para o paciente internado em UTI? e-Acadêmica, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 1-9, 2022. DOI: 10.52076/eacad-v3i3.277.

ZHAN, Yujuan; HU, Huiting; YU, Ying; CHENG, Cuimei; ZHANG, Jingwen; JARNDA, Kermue Vasco; DING, Ping. Therapeutic strategies for drug-resistant Pseudomonas aeruginosa: Metal and metal oxide nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A, Hoboken, v. 112, n. 9, p. 1343-1363, 2024. DOI: 10.1002/jbm.a.37677.

CÓDIGO: ET0683

AUTOR: DANILO DE FREITAS SOUSA ARAUJO

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: Análise in vitro de células ósseas em liga de titânio modificadas por plasma atmosférico a frio.

Resumo

O titânio é amplamente utilizado em implantes ósseos devido à sua resistência mecânica e biocompatibilidade, porém sua superfície não tratada apresenta baixa reatividade, o que pode limitar a adesão celular e retardar a osseointegração. A modificação da superfície por plasma atmosférico frio (CAP) pode melhorar essa interação célula-superfície, mas seus efeitos sobre a ultraestrutura celular ainda são pouco conhecidos. Por isso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a ultraestrutura de pré-osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio tratadas com CAP. Com esse intuito, discos de titânio grau II foram tratados com plasma atmosférico frio (CAP) e comparados a um grupo controle (apenas polido), sendo posteriormente cultivados com células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 e analisados por microscopia eletrônica de transmissão após 24 horas. As células cultivadas sobre as superfícies tratadas com CAP apresentaram mitocôndrias alongadas e interconectadas, indicando predomínio de fusão mitocondrial e maior eficiência na fosforilação oxidativa, além de maior interação célula-célula, em contraste com o padrão de mitocôndrias curtas e fragmentadas observado no grupo controle. Esses resultados indicam que o tratamento por CAP favorece um estado metabólico mais adequado à atividade osteoblástica e estimula a comunicação intercelular, reforçando seu potencial como estratégia eficaz para melhorar a biocompatibilidade de superfícies de titânio destinadas a implantes ósseos.

Palavras-chave: Dinâmica mitocondrial; Titânio; Osseointegração;

TITLE: Cellular ultrastructure of the effect of cold atmospheric plasma on pre-osteoblasts

Abstract

Titanium is widely used in bone implants due to its mechanical strength and biocompatibility; however, its untreated surface exhibits low reactivity, which can limit cell adhesion and delay osseointegration. Surface modification by cold atmospheric plasma (CAP) may improve this cell-surface interaction, but its effects on cellular ultrastructure remain poorly understood. Therefore, the aim of this study was to characterize the ultrastructure of pre-osteoblasts cultured on CAP-treated titanium

surfaces. To this end, grade II titanium discs were treated with cold atmospheric plasma (CAP) and compared to a control group (polished only), subsequently cultured with MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells and analyzed by transmission electron microscopy after 24 hours. Cells cultured on CAP-treated surfaces exhibited elongated and interconnected mitochondria, indicating a predominance of mitochondrial fusion and greater efficiency in oxidative phosphorylation, in addition to increased cell-cell interaction, in contrast to the pattern of short and fragmented mitochondria observed in the control group. These results indicate that CAP treatment favors a metabolic state more suitable for osteoblastic activity and stimulates intercellular communication, reinforcing its potential as an effective strategy to improve the biocompatibility of titanium surfaces intended for bone implants.

Keywords: Mitochondrial dynamics; Titanium; Osseointegration;

Introdução

O titânio (Ti) é amplamente utilizado na fabricação de implantes ósseos devido à sua resistência mecânica e biocompatibilidade, características que sustentam sua capacidade de promover a osseointegração, ou seja, a formação de uma ligação direta e estável entre o implante e o tecido ósseo (MARTINS et al., 2025; WANG et al., 2020). Contudo, a superfície do titânio não tratada apresenta baixa reatividade química, o que pode limitar a adesão e a proliferação das células responsáveis pela formação óssea, retardando o processo de osseointegração (MARTINS et al., 2025). Entre as estratégias desenvolvidas para tornar a superfície do titânio mais favorável à resposta biológica está o tratamento por plasma atmosférico frio (Cold Atmospheric Plasma – CAP), um gás parcialmente ionizado que, mesmo contendo elétrons de alta energia, mantém temperatura próxima à ambiente, permitindo sua aplicação direta sobre materiais biológicos sem causar danos térmicos (HUI et al., 2020). O CAP promove a remoção de contaminantes orgânicos e a incorporação de grupos funcionais hidrofílicos na superfície do titânio, aumentando sua molhabilidade e sua capacidade de interação com proteínas e células (YAN et al., 2022; GUND et al., 2024). Essas modificações podem promover respostas biológicas, pois podem aumentar a adesão celular, estimular a formação de filopódios e podem ser observadas diretamente na morfologia das células em contato com a superfície tratada. (MARTINS et al., 2025; YAN et al., 2022). Apesar disso, há poucas informações sobre os efeitos da ultraestrutura celular resultante do contato com superfícies modificadas pelo CAP. Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar o efeito do plasma atmosférico frio sobre a ultraestrutura de células pré-osteoblásticas cultivadas em superfícies de titânio.

Metodologia

Confecção das amostras de titânio Foram utilizados discos de titânio grau II (9 mm de diâmetro, 3 mm de espessura). As amostras foram lixadas sequencialmente com lixas de SiC (220 a 2000) e polidas por 30 minutos em solução de sílica coloidal (40%) e peróxido de hidrogênio (60%). Em seguida, foram limpas em detergente enzimático 0,5% e água destilada, com duas etapas de ultrassom de 10 minutos, intercaladas por lavagem em etanol absoluto e água destilada. Após secagem, os discos foram divididos em dois grupos: controle (apenas polido) e CAP. Tratamento por plasma atmosférico

frio (CAP) O tratamento foi realizado com gás hélio (1 L/min), tensão de 13 kV, frequência de 600 Hz e distância de 20 mm entre a fonte de plasma e a amostra. O jato foi aplicado em cinco pontos da superfície, 3 minutos cada, totalizando 15 minutos de exposição por disco, garantindo o tratamento uniforme de toda a área, conforme protocolo de Martins et al. (2024). Cultura de células Células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 (ATCC) foram cultivadas em meio α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO2, com troca do meio a cada 48 horas, (MOURA et al., 2016). Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) Após 24 horas de cultivo sobre os discos, as células foram lavadas em PBS, fixadas em glutaraldeído 2,5% por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e contrastadas em bloco com acetato de uranila 2%. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, infiltradas em resina Spurr. Todo o material foi processado mantendo as células em contato com a superfície, a separação do material foi separado do bloco de resina com uso de nitrogênio líquido. Em seguida os blocos foram seccionados em ultramicrótomo (cortes de 70–90 nm), contrastados com citrato de chumbo 0,5% e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL a 120 kV.

Resultados e Discussões

A análise ultraestrutural revelou diferenças na morfologia mitocondrial entre os grupos. Nas células cultivadas sobre titânio polido (controle), as mitocôndrias apresentaram-se curtas e fragmentadas, padrão compatível com predomínio de fissão mitocondrial. Já nas células cultivadas sobre as superfícies tratadas com plasma atmosférico frio (CAP), as mitocôndrias mostraram-se predominantemente alongadas e interconectadas, características associadas à fusão mitocondrial. Essa diferença é relevante porque a morfologia mitocondrial está diretamente ligada à eficiência metabólica da célula. A fusão mitocondrial favorece a fosforilação oxidativa, aumentando a disponibilidade de ATP e criando um estado metabólico mais adequado à atividade e à diferenciação osteoblástica (SHI et al., 2025; SUH; LEE, 2024). Em contrapartida, a fragmentação mitocondrial observada no grupo controle está associada a menor eficiência da fosforilação oxidativa e a um possível deslocamento do metabolismo celular para a via glicolítica, menos eficiente na geração de energia (SHI et al., 2025). Outro resultado observado foi o aumento da interação célula-célula nas superfícies tratadas por CAP em comparação ao controle. Essa maior conectividade intercelular é um indicativo positivo para a resposta osteogênica, já que a comunicação direta entre células, mediada principalmente por junções comunicantes, como a conexina 43, é essencial para a coordenação da diferenciação osteoblástica e da formação da matriz óssea (MA et al., 2024). Dessa forma, os resultados sugerem que o tratamento por CAP não apenas favorece a adesão celular, mas também cria um microambiente mais propício à comunicação e à maturação das células pré-osteoblásticas.

Conclusão

Os resultados deste estudo permitiram caracterizar a ultraestrutura de pré-osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio tratadas com plasma atmosférico frio (CAP). Além disso, o CAP favoreceu a interação célula-célula, reforçando seu potencial em

estimular a comunicação intercelular necessária à diferenciação osteoblástica. Esses resultados confirmam que o CAP é uma alternativa eficaz para melhorar a biocompatibilidade de superfícies de titânio, favorecendo condições celulares mais próximas às necessárias para a osseointegração.

Referências

CHENG, A.; CHEN, H.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Imaging analysis of the interface between osteoblasts and micro-rough surfaces of laser-sintered titanium alloy constructs. Journal of Microscopy, v. 270, n. 1, p. 41-52, 2018. GUND, M. P.; NAIM, J.; LEHMANN, A. et al. Cold Atmospheric Plasma Improves the Colonization of Titanium With Primary Human Osteoblasts: An In Vitro Study. Biomedicines, v. 12, n. 3, p. 673, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3390/biomedicines12030673. HUI, W. L.; PERROTTI, V.; IACULLI, F.; PIATTELLI, A.; QUARANTA, A. The Emerging Role of Cold Atmospheric Plasma in Implantology: A Review of the Literature. Nanomaterials, v. 10, n. 8, p. 1505, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/nano10081505. MA, L.; WANG, W.; XU, G.; LI, H.; LIU, F.; SHAO, H.; ZHANG, X.; MA, Y.; LI, G.; LI, H.; GAO, S.; LING, P. Connexin 43 in the function and homeostasis of osteocytes: a narrative review. Annals of Joint, v. 9, p. 10, 2024. MARTINS, G. M.; SABINO, V. G.; VITORIANO, J. O. et al. Temperature Influence on the Aging of Titanium Surfaces Treated With Cold Atmospheric Plasma: Impact on Physicochemical Properties and Biological Responses. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 113, e35667, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jbm.b.35667. MOURA, C. E. B.; SILVA, N. B.; SÁ, J. C.; CAVALCANTI JUNIOR, G. B.; MEDEIROS, S. R. B. de; ROCHA, H. A. O.; PAPA, P. C.; ALVES JÚNIOR, C. MC3T3-E1 cells behavior on surfaces bombarded by argon ions in planar cathode discharge. Artificial Organs, v. 40, n. 5, p. 497-504, 2016. SHI, Q.; SONG, Y.; CAO, J.; NA, J.; YANG, Z.; CHEN, X.; WANG, Z.; FAN, Y.; ZHENG, L. Inhibition of Mitochondrial Fission Reverses Simulated Microgravity-Induced Osteoblast Dysfunction by Enhancing Mechanotransduction and Epigenetic Modification. Research, v. 8, p. 0602, 2025. SUH, J.; LEE, Y.-S. The multifaceted roles of mitochondria in osteoblasts: from energy production to mitochondrial-derived vesicle secretion. Journal of Bone and Mineral Research, v. 39, n. 9, p. 1205-1214, 2024. WANG, Q.; ZHOU, P.; LIU, S. et al. Multi-Scale Surface Treatments of Titanium Implants for Rapid Osseointegration: A Review. Nanomaterials, v. 10, n. 6, p. 1244, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/nano10061244. YAN, M.; HARTJEN, P.; GOSAU, M. et al. Effects of a Novel Cold Atmospheric Plasma Treatment of Titanium on the Proliferation and Adhesion Behavior of Fibroblasts. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 1, p. 420, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms23010420.

CÓDIGO: ET0912

AUTOR: LARISSA SIMOES DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

TÍTULO: Efeitos do estresse térmico sobre o metabolismo do coral escleractíneo Siderastrea sp

Resumo

O aumento do CO_2 atmosférico provoca o aquecimento e acidificação dos oceanos, ameaçando processos fisiológicos fundamentais e a sobrevivência de corais construtores como a Siderastrea sp. O estudo avaliou os impactos do estresse térmico (32 °C) e da fase de recuperação sobre a calcificação, produção primária, respiração e o balanço metabólico da espécie. Vinte colônias coletadas nos parrachos de Rio do Fogo/RN foram submetidas a 32 °C por 19 dias, seguidos de um retorno gradual para 27 °C. O metabolismo foi quantificado através de incubações claras e escuras, medindo as variações de oxigênio dissolvido e de alcalinidade total. A calcificação não apresentou variações significativas entre os tratamentos ($p=0,355$), sugerindo que os efeitos físico-químicos pelo aumento da temperatura na saturação da aragonita compensaram os prejuízos biológicos. Contudo, o estresse térmico reduziu a produção primária líquida (PPL) e desequilibrou o balanço metabólico (razão PPB:R<1), indicando que a fotossíntese não supria a demanda energética. Mesmo na fase de recuperação, a PPL permaneceu negativa, sugerindo que o tempo foi insuficiente para o restabelecimento das zooxantelas. O estresse térmico comprometeu o balanço energético do coral, evidenciando que a manutenção da calcificação estável não exclui impactos fisiológicos decorrentes do aquecimento global.

Palavras-chave: Coral, Siderastrea sp., estresse térmico, metabolismo

TITLE: Effects of thermal stress on the metabolism of the scleractinian coral Siderastrea sp.

Abstract

The increase in atmospheric CO_2 drives ocean warming and acidification, threatening fundamental physiological processes and the survival of reef-building corals such as Siderastrea sp. This study evaluated the impacts of thermal stress (32 °C) and a recovery phase on calcification, primary production, respiration, and the metabolic balance of this species. Twenty colonies collected at the Rio do Fogo/RN reef ecosystem were exposed to 32 °C for 19 days, followed by a gradual return to 27 °C. Metabolism was quantified through light and dark incubations by measuring variations in dissolved oxygen and

total alkalinity. Calcification showed no significant differences among treatments (p=0.355), suggesting that the physicochemical effects of increased temperature on aragonite saturation compensated for the biological impairments. However, thermal stress reduced net primary production (NPP) and disrupted the metabolic balance (GP:R ratio<1), indicating that photosynthesis did not meet the energetic demand. Even during the recovery phase, NPP remained negative, suggesting that the recovery period was insufficient for the re-establishment of zooxanthellae. Thermal stress compromised the coral's energy budget, demonstrating that maintaining stable calcification rates does not preclude severe physiological impacts stemming from global warming.

Keywords: Coral, Siderastrea sp., Thermal stress, Metabolism

Introdução

As atividades humanas, principalmente a queima de combustíveis fósseis, elevaram os níveis de CO2 atmosférico, provocando aquecimento e acidificação dos oceanos. O aumento do CO2 desequilibra o sistema de carbonatos, criando condições desfavoráveis para organismos calcificadores, sobretudo os que dependem da disponibilidade de carbonato para formar estruturas calcárias (Doo *et al.*, 2019).
A redução na saturação de carbonato de cálcio (CaCO3) compromete a capacidade dos corais de construir seus esqueletos, resultando em taxas de crescimento reduzidas, anormalidades estruturais e maior risco de dissolução (Doo *et al.*, 2019). Segundo Noonan *et al*. (2018), níveis de saturação de aragonita (Ωarag) abaixo de 2,3 associam-se a taxas de calcificação líquida baixas ou negativas, comprometendo o crescimento e a manutenção estrutural das comunidades recifais.
Além da acidificação, o aumento da temperatura oceânica ameaça os ecossistemas recifais, pois o estresse térmico compromete processos fisiológicos fundamentais e eleva a ocorrência de branqueamento e mortalidade (Krämer *et al*., 2022). Os recifes estão entre os ecossistemas marinhos mais vulneráveis às mudanças climáticas, e a degradação dos corais construtores afeta a estrutura e o funcionamento de toda a comunidade recifal (Lachs *et al*., 2023).
No Brasil, ondas de calor marinhas recentes têm sido associadas a episódios de branqueamento e mortalidade em ambientes recifais (Duarte *et al*., 2020). O branqueamento ocorre quando o estresse térmico interfere na relação entre o coral e os dinoflagelados simbiontes, podendo reduzir ou eliminar esses simbiontes e seus pigmentos fotossintéticos (Krämer *et al.*, 2022).
O metabolismo dos recifes é controlado pela integração entre as vias do carbono orgânico e inorgânico (Gattuso *et al*., 1999). No ciclo orgânico, a produção primária bruta (PPB) representa o carbono fixado pela fotossíntese das zooxantelas, consumindo carbono inorgânico dissolvido (CID) da água (Zeebe & Wolf-Gladrow, 2001); a respiração (R) reflete o gasto energético do holobionte, liberando CID. A diferença entre PPB e R define a Produção Primária Líquida (PPL = PPB - R): quando PPB/R > 1, o sistema é autotrófico; quando PPB/R < 1, é heterotrófico (Gattuso *et al.*, 1999).
O ciclo do carbono inorgânico é medido pela calcificação líquida (G), saldo entre precipitação e dissolução de $CaCO_3$ (Gattuso *et al*., 1999). A precipitação consome Ca^{2+} e CO_3^{2-}, reduzindo a Alcalinidade Total (AT), enquanto a dissolução libera esses íons e a eleva (Zeebe & Wolf-Gladrow, 2001). PPB e G são processos acoplados, pois a energia gerada pela fotossíntese dos simbiontes sustenta o alto custo energético da calcificação (Barnes & Chalker, 1990; Gattuso *et al*., 1999).

Entre os corais do Atlântico Sul, *Siderastrea sp*. é considerada relativamente tolerante a variações ambientais (Leão *et al*., 2003), mas eventos recentes mostram que essa tolerância não impede resposta ao estresse térmico: no Atol das Rocas, Gaspar *et al*. (2021) observaram 88% de branqueamento em 2019, associado a ondas de calor marinhas; em recifes do Ceará, 91% das colônias apresentaram branqueamento durante estresse térmico intenso em 2020 (Lucas *et al.*, 2023). Alguns efeitos do estresse térmico persistem mesmo após o fim da exposição, já que a recuperação fisiológica do coral pode não ser imediata (Boodraj *et al*., 2026).
Diante das mudanças climáticas, compreender as respostas fisiológicas de *Siderastrea sp*. ao aumento da temperatura e sua recuperação metabólica é essencial para entender sua tolerância ao aquecimento oceânico.
Este trabalho avaliou os efeitos do estresse térmico e da recuperação sobre a fisiologia de *Siderastrea sp*., considerando alterações na calcificação, produção primária líquida (PPL), respiração (R) e balanço metabólico (PPB:R).

Metodologia

2.1 Área de estudo e amostragem

Os recifes dos parrachos de Rio do Fogo (5° 16′ 22″ S, 35° 22′ 58″ O), no Rio Grande do Norte, a 70 km da capital e 6 km da cidade de Rio do Fogo são recifes rasos (2-6 m de profundidade), expostos na maré baixa. Estão inseridos na Área de Proteção Ambiental Recifes de Corais (APARC), litoral norte do RN, abrangendo Maxaranguape, Rio do Fogo e Touros **(Figura 1).**
Para o experimento de estresse térmico, 20 colônias saudáveis de Siderastrea sp. (diâmetro médio ≈4 cm) foram coletadas em 27/02/2025 e levadas ao Laboratório de Experimentação Aquática (LEXA-UFRN), onde permaneceram em aquários sob fotoperíodo 12:12 e aclimatação de uma semana a 27 °C. Após esse período, cada colônia foi distribuída aleatoriamente em um dos 20 aquários.

2.2 Delineamento experimental e manutenção do sistema de estresse térmico em laboratório.

O experimento utilizou 20 aquários de 30 L, organizados em dois sistemas independentes de recirculação (dez aquários cada, 300 L de água do mar por sistema). Bombas conduziam água filtrada aos aquários, com torneiras individuais para ajuste do fluxo. O controle térmico foi feito por chiller programável e aquecedores de 300 W, conforme o tratamento. A limpeza e renovação total da água ocorreram semanalmente, com transferência temporária das colônias para outro aquário na mesma temperatura do tratamento.
A iluminação foi fornecida por lâmpadas LED CTLite G4 Aquarium, em fotoperíodo de 12h luz/12h escuro, reproduzindo o ciclo diário **(Figura 2).**

2.3 Tratamentos experimentais ao estresse térmico

Após aclimatação, às 20 colônias foram divididas entre os dois sistemas: dez no controle (27 °C constante durante todo o experimento) e dez no tratamento de estresse térmico. Neste, a temperatura foi elevada gradualmente em 1 °C/dia por cinco dias até 32 °C, mantida por 19 dias consecutivos (estresses E1, E2, E3 e E4).]
Em seguida, iniciou-se a recuperação: redução de 1 °C/dia por cinco dias até retornar a 27 °C, condição mantida estável até o fim do experimento, com duração total de 88 dias **(Figura 3).**
Variáveis físico-químicas (pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e nutrientes) foram monitoradas ao longo do experimento, sob a mesma iluminação LED

em ciclo circadiano. Pela manhã, a intensidade luminosa variou entre 36,0 e 820,4 µmol de fótons m^{-2} s^{-1}, com pico entre 11h e 15h (mediana de 1.004,5 µmol de fótons m^{-2} s^{-1}). A radiação foi medida com sensor de luminosidade (Odyssey, Dataflow Systems Pty Ltd, Nova Zelândia), calibrado com sensor quantum (LI-192, LI-COR Environmental, EUA) acoplado ao LI-1400 data logger (LI-COR Environmental, EUA).

2.4 Quantificação do metabolismo e do sistema carbonato

O metabolismo das colônias e as alterações do sistema carbonato foram quantificados por incubações em três etapas (final da aclimatação, estresse térmico e recuperação), em condições clara e escura, representando dia e noite.

Na fase escura, as lâmpadas eram desligadas cerca de 30 min antes, e os recipientes cobertos com sacolas plásticas pretas. As colônias foram incubadas individualmente em recipientes acrílicos transparentes de 400 mL. Frascos de DBO de 250 mL foram usados para descontar a contribuição metabólica do plâncton (branco de incubação).

No início de cada incubação, pH, salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos no aquário, e amostras de água coletadas para alcalinidade total (AT; 50 mL preservados com HgCl2 saturado). Os recipientes foram então fechados para iniciar a incubação: 2h30 sob luz e 1h30 no escuro, evitando que o OD caísse abaixo de 80% de saturação (adaptado de Carlot *et al.*, 2022). Ao final, as variáveis físico-químicas foram remedidas e novas amostras coletadas para AT **(Figura 4).**

2.5 Análises químicas e cálculos do metabolismo

A AT das amostras foi determinada por titulação potenciométrica com HCl 0,1 M, seguindo o método SOP03b de Dickson *et al*. (2007), no titulador ECO Titrator Metrohm®, com concentrações obtidas pela equação de Gran.

As taxas de calcificação/dissolução de $CaCO_3$ (G) basearam-se na técnica da anomalia da alcalinidade (Smith; Kinsey, 1978), assumindo que 1 mol de $CaCO_3$ precipitado reduz a AT em 2 mols. A taxa bruta foi calculada por $G = -0{,}5 \times \rho w \times (\Delta AT/\Delta t)$, sendo ρw a densidade da água do mar e $\Delta AT/\Delta t$ a taxa de variação da AT no intervalo de incubação, normalizada pela área superficial da colônia (Schneider; Erez, 2006).

A PPL foi calculada pela variação de O_2 durante as mesmas incubações [PPL = (ΔO2 coral − ΔO2 branco) × V aquário / (T × SA)], também normalizada pela área da colônia (Schneider; Erez, 2006). O balanço metabólico foi obtido pela razão PPB:R, em que PPB = PPL + R (PPL e R determinados pelas variações de OD nas incubações clara e escura, respectivamente). PPB:R > 1 indica produção primária superior à respiração; PPB:R < 1, o inverso.

2.8 Tratamento estatístico

Os dados de calcificação (G), produção primária líquida (PPL), respiração (R) e razão PPB:R foram analisados no R (versão 4.6.1) por modelos lineares mistos, com tratamento, incubação e sua interação como efeitos fixos, dado que as mesmas repetições experimentais foram avaliadas ao longo das fases de incubação.

Após o ajuste, aplicou-se ANOVA tipo III para os efeitos do tratamento, da incubação e da interação; diferenças significativas foram seguidas de comparações múltiplas com ajuste de Tukey, com nível de significância de $p < 0{,}05$, usando os pacotes lme4, lmerTest e emmeans.

Resultados e Discussões

Durante as etapas de estresse, o tratamento térmico apresentou temperaturas médias entre 31,04 ± 0,43 °C (E2) e 32,01 ± 0,17 °C (E3), enquanto o controle variou de 27,10

± 0,07 °C (E2) a 28,89 ± 0,10 °C (E4). Com diferença de aproximadamente 3–4 °C entre os tratamentos, confirmando a manutenção das condições térmicas no experimento **(Tabela 1)**.

Com o aumento da temperatura, foram observados menores valores de oxigênio dissolvido no tratamento térmico. A concentração variou de 5,40 ± 0,07 mg L^{-1} no (E4) a 5,60 ± 0,09 mg L^{-1} (E2), enquanto no controle variou de 6,06 ± 0,04 mg L^{-1} (E4) a 6,17 ± 0,05 mg L^{-1} (E2). A saturação também foi menor no tratamento térmico, variando de 90,10 ± 0,76% a 92,21 ± 0,96%, enquanto no controle variou de 93,48 ± 0,64% a 95,20 ± 0,85%.

A menor disponibilidade de oxigênio observada no tratamento térmico pode estar relacionada à diminuição física da solubilidade do O2 em águas com temperaturas elevadas (Garcia e Gordon,1992). Além da limitação física, o aumento da temperatura intensifica o metabolismo dos corais, provocando um desequilíbrio entre a produção fotossintética e a demanda respiratória, resultando em um déficit no balanço de oxigênio para o coral (PARRY; KLEIN; DUARTE, 2025).

Contudo, a saturação de oxigênio manteve-se acima de 90% em todos os tratamentos, indicando que as condições permaneceram adequadamente oxigenadas durante o experimento. Dessa forma, o oxigênio não parece ter sido um fator adicional de estresse, sugerindo que as respostas observadas estiveram principalmente associadas ao aumento da temperatura (GRAVINESE *et al.*, 2021; DHILLON *et al*., 2024).

O pH permaneceu relativamente estável entre os tratamentos, variando de 8,10 ± 0,01 no controle (E1) a 8,23 ± 0,02 no tratamento térmico (E2), sem apresentar uma tendência consistente de aumento ou redução associada ao aquecimento. A salinidade também apresentou valores próximos entre os tratamentos durante o estresse, variando de 35,4 ± 0,13 no controle (E4) a 38,17 ± 0,14 no tratamento térmico (E2).

Durante a recuperação, as condições físico-químicas se aproximaram entre os tratamentos. A temperatura foi de 27,01 ± 0,10 °C no controle e 27,58 ± 0,12 °C no tratamento térmico, enquanto o oxigênio dissolvido foi de 6,13 ± 0,06 e 6,10 ± 0,11 mg L^{-1}. O pH também permaneceu estável, com 8,15 ± 0,03 no controle e 8,14 ± 0,02 no tratamento térmico. A salinidade apresentou 35,7 ± 0,00 no controle e 36,1 ± 0,00 no tratamento térmico.

As taxas de calcificação variaram entre -0,96 e 3,53 umol CaCO3.cm-2.h-1, com o menor valor durante a aclimatação e o maior na etapa E3, ambos no grupo controle. Não foram observadas variações significativas entre as condições de luminosidade (claro e escuro) nem entre os tratamentos controle e estresse (p = 0,355) **(Figura 5)**.

Nas comparações múltiplas, E3 apresentou calcificação maior do que todas as demais incubações, tanto no escuro quanto na luz, enquanto a aclimatação, os estresses térmicos E1, E2, E4 e recuperação não diferiram entre si. Era esperada uma maior calcificação na presença de luz, devido à energia fornecida pela fotossíntese dos simbiontes, mas isso não ficou evidente. O aumento da calcificação observado em E3, ocorreu tanto no controle quanto no térmico, o que indica que esse padrão não teve relação com o aumento da temperatura.

A tolerância térmica e a plasticidade fisiológica de *Siderastrea sp.* podem ter contribuído para a manutenção da calcificação no tratamento térmico, validando a alta resiliência da espécie frente às variações ambientais estressantes (Leão & Kikuchi, 2005). Porém, a relação entre temperatura e calcificação é complexa, pois envolve tanto processos físico-químicos, associados aos efeitos da temperatura sobre o sistema carbonato e o estado de saturação da aragonita, quanto processos fisiológicos relacionados à interação simbiótica entre o coral e suas microalgas.

Sob a perspectiva físico-química, o aumento da temperatura da água pode favorecer a calcificação ao modificar o equilíbrio do sistema carbonato e aumentar o estado de saturação da aragonita, condição termodinamicamente favorável à precipitação de $CaCO_3$ (Allison *et al.*, 2021).
Em contrapartida, o estresse térmico pode comprometer a associação coral-microalga e reduzir a contribuição das microalgas simbiontes para a calcificação, uma vez que a fotossíntese remove CO_2 do microambiente intracelular e pode favorecer as condições para a precipitação de $CaCO_3$ em corais saudáveis (Gattuso et al., 1999). Assim, embora a nossa hipótese assuma uma redução das taxas de calcificação em resposta ao estresse térmico, os efeitos potencialmente negativos decorrentes do comprometimento da simbiose podem ter sido parcialmente compensados pelas alterações físico-químicas do sistema carbonato associadas ao aumento da temperatura.
A atuação simultânea e em sentidos opostos desses processos pode, portanto, ter contribuído para a ausência de diferenças significativas nas taxas de calcificação de Siderastrea sp. entre os tratamentos, mesmo sob estresse térmico.
Em nossos experimentos, esses processos podem ter sido contrabalanceados, resultando em mudanças não significativas na calcificação, devido à compensação entre o estresse biológico nos simbiontes e os efeitos termodinâmicos do aumento da temperatura na precipitação de $CaCO_3$.

No tratamento controle, a razão PPB:R aumentou ao longo das incubações, especialmente a partir de E3, atingindo os maiores valores na etapa de recuperação e superiores ao tratamento térmico. No tratamento térmico não houve diferenças significativas entre as incubações **(Figura 6)**.
A partir do estresse E3, o controle apresentou razão PPB:R superior a 1, indicando que a produção fotossintética superou a demanda respiratória. Já o tratamento térmico permaneceu abaixo de 1 durante todas as etapas, mostrando que a produção fotossintética não foi suficiente para suprir completamente as demandas metabólicas.
O padrão observado é coerente com a redução da PPL e o maior consumo de oxigênio observado no tratamento térmico, mostrando um possível desequilíbrio energético provocado pelo estresse térmico. Os resultados foram semelhantes ao trabalho de Paradis et al. (2019), que verificou uma redução da razão fotossíntese:respiração com o aumento da temperatura e PPB:R < 1 quando os corais não conseguiam suprir suas demandas metabólicas (Paradis et al., 2019).
Na etapa final do experimento, a PPB:R do tratamento térmico se aproximou de 1, sugerindo uma melhora do metabolismo após o estresse, mas ainda sem alcançar os valores do controle. As taxas de PPL aumentaram ao longo do tempo no grupo controle, alcançando maiores valores na etapa final do experimento, correspondentes ao período de recuperação, quando comparados às etapas de aclimatação, estresse E1 e E2 ($p = 0,002$) **(Figura 7).**
A redução da PPL no tratamento térmico está diretamente relacionada ao estresse térmico sofrido pela colônia, que leva à expulsão das zooxantelas (branqueamento). Com a perda dessas microalgas, ocorre uma queda drástica na fixação e na transferência de carbono fotossintético para o coral, privando-o de sua principal fonte de energia autotrófica. Para compensar esse déficit, o coral eleva sua demanda por nutrição heterotrófica, o que se reflete no aumento das taxas respiratórias ao longo do tempo (Grottoli *et al*., 2006; Krämer *et al*., 2022).
Ao mesmo tempo, os valores mais negativos de respiração visto no estresse E3 indicam maior consumo de oxigênio, possivelmente relacionado ao aumento da demanda energética para manutenção, defesa e reparo celular (Paradis *et al*., 2019), esse

desequilíbrio entre menor produção fotossintética e maior gasto energético pode explicar a diferença entre os tratamentos nessa fase. Durante o estresse, o tratamento térmico também apresentou menores concentrações de oxigênio dissolvido, principalmente no estresse E3. Essa redução pode estar relacionada à menor solubilidade do oxigênio em temperaturas elevadas e pode intensificar os efeitos do estresse térmico (Alderdice *et al.*, 2022).
Na etapa de recuperação, a PPL tornou-se positiva no controle, mas permaneceu negativa no tratamento térmico, sugerindo que o tempo de recuperação não foi suficiente para a recolonização pelas zooxantelas e restabelecimento das condições metabólicas por produção autotrófica.

Conclusão

Os resultados mostram que o efeito do tratamento do estresse térmico não teve influência para a calcificação de Siderastrea sp., esse resultado pode ter sido influenciado pelo período da incubação e tempo do experimento, além de uma possível tolerância da espécie a temperaturas mais elevadas. As alterações na PPL, respiração e na razão PPB:R mostraram que a exposição à temperaturas mais altas mudou o balanço energético das colônias de corais, principalmente nas fases mais avançadas do estresse. Mesmo com o retorno da temperatura na fase da recuperação para as condições iniciais do experimento, a PPL permaneceu negativa e a razão da PPB:R do tratamento térmico não alcançaram os valores observados no controle. Esses resultados contribuem para compreender como Siderastrea sp. responde fisiologicamente ao aumento da temperatura, mostrando que a manutenção da calcificação não significa ausência de efeitos do estresse térmico, principalmente, em avaliações de uma maior exposição temporal a esse estressor. As alterações metabólicas observadas durante e após o aquecimento reforçam a importância de avaliar diferentes respostas fisiológicas para compreender a tolerância e a capacidade de recuperação da espécie diante de eventos de aquecimento. Uma recomendação para pesquisas futuras, seria aumentar o período do experimento e das incubações para avaliar a calcificação, e um maior período de recuperação para permitir a determinação do tempo necessário para que Siderastrea sp. consiga restabelecer o seu metabolismo.

Referências

DOO, S. S.; EDMUNDS, P. J.; CARPENTER, R. C. Ocean acidification effects on in situ coral reef metabolism. Scientific Reports, v. 9, n. 1, 12067, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/S41598-019-48407-7. KRÄMER, W. E.; IGLESIAS-PRIETO, R.; ENRÍQUEZ, S. Evaluation of the current understanding of the impact of climate change on coral physiology after three decades of experimental research. Communications Biology, v. 5, art. 1418, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s42003-022-04353-1 LACHS, L.; DONNER, S. D.; MUMBY, P. J.; BYTHELL, J. C.; HUMANES, A.; EAST, H. K.; GUEST, J. R. Emergent increase in coral thermal tolerance reduces mass bleaching under climate change. Nature Communications, v. 14, art. 4939, 2023. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41467-023-40601-6 GATTUSO, J.-P.; ALLEMAND, D.; FRANKIGNOULLE, M. Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: a review on

interactions and control by carbonate chemistry. American Zoologist, v. 39, n. 1, p. 160–183, 1999. ZEEBE, R. E.; WOLF-GLADROW, D. CO2 in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes. Amsterdam: Elsevier Oceanography Series, v. 65, 2001. 346 p. BARNES, David J.; CHALKER, Bruce E. Calcification and photosynthesis in reef-building corals and algae. In: DUBINSKY, Zvy (ed.). Coral Reefs. Amsterdam: Elsevier Science, 1990. cap. 6, p. 109-131. (Ecosystems of the World, 25). BOODRAJ, P.; GLASSOM, D.; VOSLOO, D. Physiological responses of intertidal and subtidal corals Anomastraea irregularis and Pocillopora verrucosa exposed to experimental thermal stress. Frontiers in Marine Science, v. 13, 2026. DOI: https://doi.org/10.3389/fmars.2026.1828013. LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P.; TESTA, V. Corals and coral reefs of Brazil. In: CORTÉS, J. (ed.). Latin American Coral Reefs. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 9-52. GASPAR, T. L. et al. Severe coral bleaching of Siderastrea stellata at the only atoll in the South Atlantic driven by sequential Marine Heatwaves. Biota Neotropica, v. 21, n. 2, e20201131, 2021. DOI: https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1131. DICKSON, Andrew G.; SABINE, Christopher L.; CHRISTIAN, J. R. (ed.). Guide to best practices for ocean CO_2 measurements. Sidney: PICES Special Publication 3, 2007. 191 p. SMITH, S. V.; KINSEY, D. W. Calcification and organic carbon metabolism as indicated by carbon dioxide. In: STODDART, D. R.; JOHANNES, R. E. (ed.). Coral reefs: research methods. Paris: UNESCO, 1978. cap. 31, p. 469-484. (Monographs on Oceanographic Methodology, 5). SCHNEIDER, K.; EREZ, J. The effect of carbonate chemistry on calcification and photosynthesis in the hermatypic coral Acropora eurystoma. Limnology and Oceanography, v. 51, n. 3, p. 1284-1293, 2006. GARCIA, H. E.; GORDON, L. I. Oxygen solubility in seawater: better fitting equations. Limnology and Oceanography, v. 37, n. 6, p. 1307-1312, 1992. DOI: https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.6.1307. PARRY, A. J.; KLEIN, S. G.; DUARTE, C. M. Thermal extremes likely trigger metabolic imbalance in coral holobionts. Scientific Reports, v. 15, e16880, 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-025-16880-y. GRAVINESE et al., 2021 GRAVINESE, P. M. et al. Severe hypoxia and warming impair the metabolic and behavioral responses of the Caribbean king crab (Mithrax spinosissimus). Biological Bulletin, v. 241, n. 3, p. 282-293, 2021. DHILLON et al., 2024 DHILLON, M. S. et al. Oxygen deprivation implicated in rapid coral mortality – an emerging perilous threat to coral reefs. bioRxiv, 2024.10.15.618297, 2024. DOI: 10.1101/2024.10.15.618297. LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P. A relic coral fauna threatened by global changes and human activities, Eastern Brazil. Marine Pollution Bulletin, v. 51, n. 5-7, p. 599-611, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.024. ALLISON, N. et al. Resolving the interactions of ocean acidification and temperature on coral calcification media pH. Coral Reefs, v. 40, n. 6, p. 1-12, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s00338-021-02170-2. PARADIS, B. T.; HENRY, R. P.; CHADWICK, N. E. Compound effects of thermal stress and tissue abrasion on photosynthesis and respiration in the reef-building coral Acropora cervicornis (Lamarck, 1816). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 521, art. 151222, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151222. GROTTOLI, Andréa G.; RODRIGUES, Lisa J.; PALARDY, James E. Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. Nature, v. 440, n. 7088, p. 1186-1189, 2006. DOI: https://doi.org/10.1038/nature04565. ALDERDICE, R. et al. Deoxygenation lowers the thermal threshold of coral bleaching. Scientific Reports, v. 12, art. 18273, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-022-22604-3. NOONAN, S. H. C.; KLUIBENSCHEDL, A.; FABRICIUS, K. E. Ocean acidification alters early successional coral reef communities and their rates of community metabolism. PLoS

ONE, v. 13, n. 5, e0197130, 2018. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197130. DUARTE, G. A. S. et al. Heat waves are a major threat to turbid coral reefs in Brazil. Frontiers in Marine Science, v. 7, art. 179, p. 1-12, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00179. LUCAS, C. C. et al. Heatwaves and a decrease in turbidity drive coral bleaching in Atlantic marginal equatorial reefs. Frontiers in Marine Science, v. 10, art. 1061488, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1061488. CARLOT, J. et al. Scaling up calcification, respiration, and photosynthesis rates of six prominent coral taxa. Ecology and Evolution, v. 12, n. 3, e8613, 2022. DOI: https://doi.org/10.1002/ece3.8613.

Anexos



Figura 1: Mapa de localização dos recifes de Rio do Fogo (RN), inseridos na Área de Proteção Ambiental Recifes de Corais (APARC).

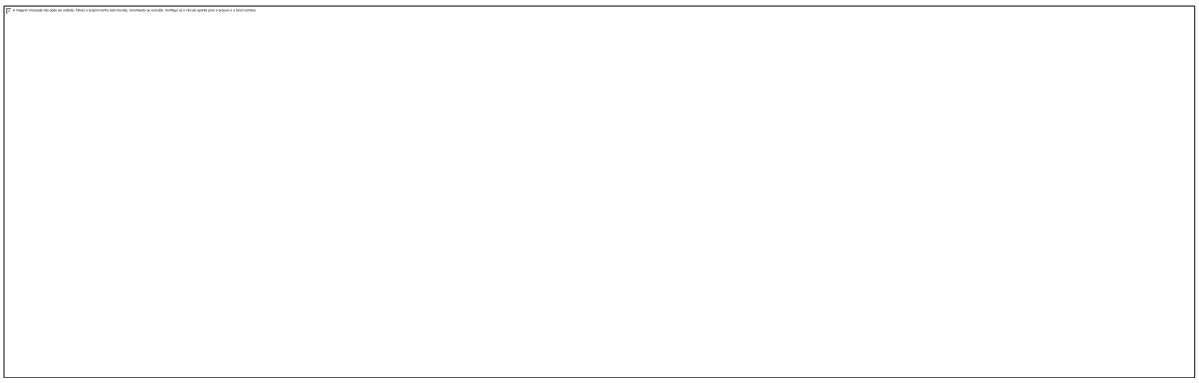


Figura 2 - Sistema de aquários com circulação de água (a), colônias (b), resfriador/controlador de temperatura © e sistema de filtro, bomba e aquecedor (d).



Figura 3 - Representação gráfica dos tratamentos controle e estresse térmico com a temperatura da água dos aquários ao longo dos 88 dias de experimento.



Figura 4: Representação das incubações realizadas no claro (a) e no escuro (b).

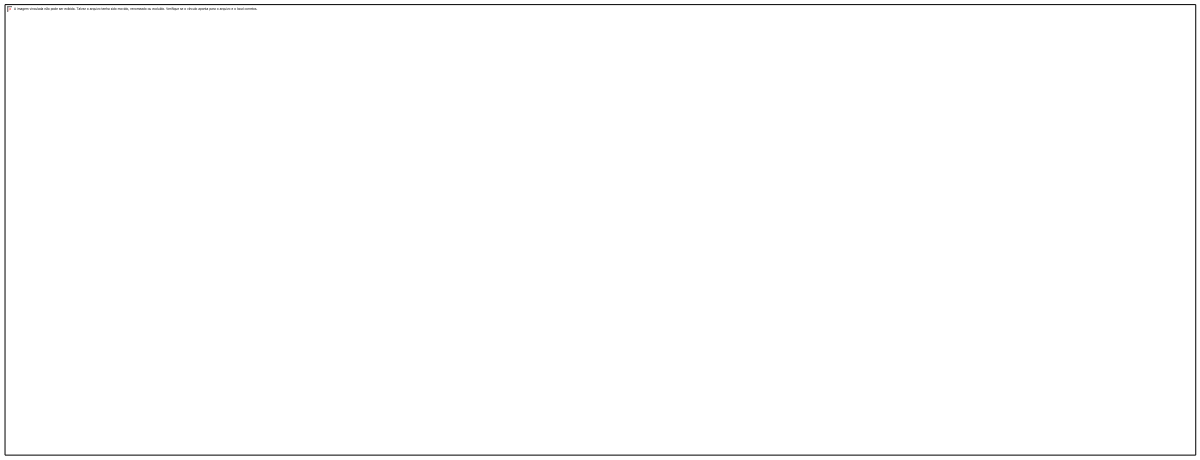


Tabela 1: Valores médios e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água durante as etapas do experimento.

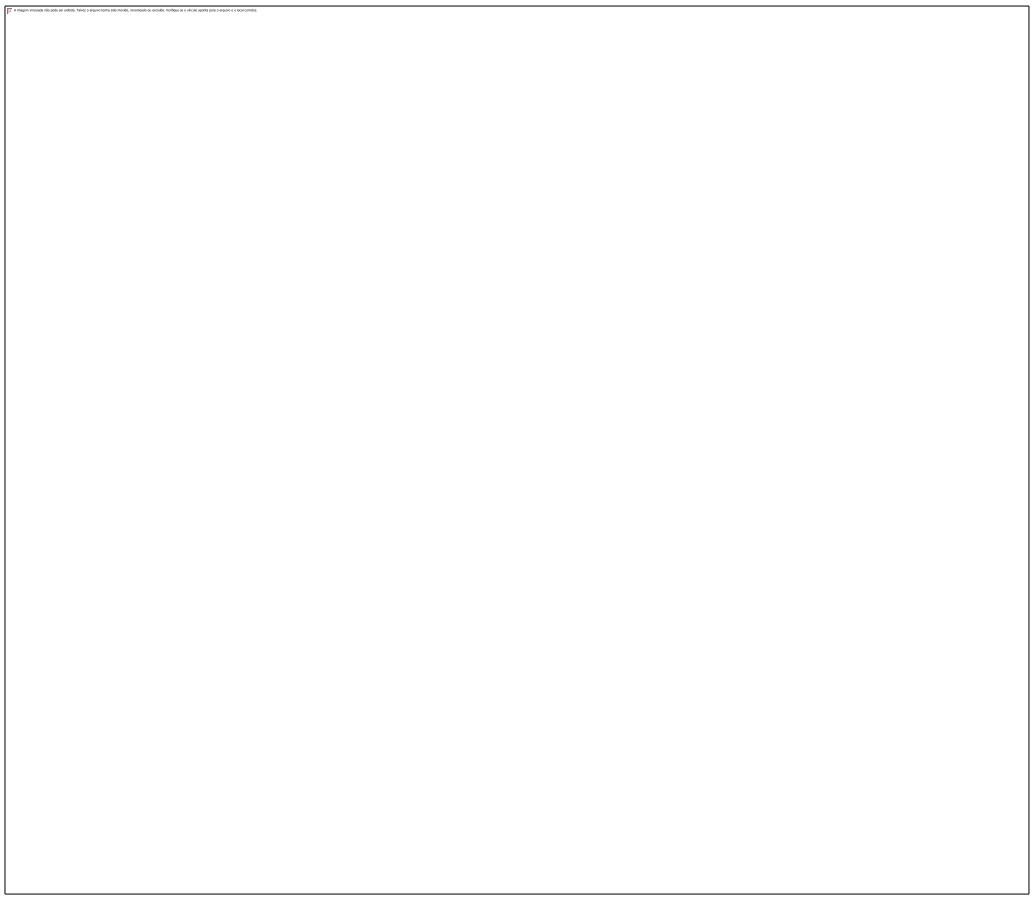


Figura 5: Efeito do estresse térmico na calcificação no tratamento claro e escuro durante o período experimental.



Figura 6: Razão entre produção primária bruta e respiração (PPB:R) nos tratamentos controle e térmico. A linha horizontal em 1,0 indica o limiar metabólico (PPB = R).



Figura 7: Variação da respiração e da produção primária líquida (PPL) entre os tratamentos controle e térmico.

CÓDIGO: ET0939

AUTOR: MARIA CLARA MENDONCA SILVA

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: Desenvolvimento de programação e o design de aplicativo mobile para área reprodutiva de tartarugas marinhas

Resumo

O acompanhamento da atividade reprodutiva de tartarugas marinhas gera um conjunto de informações espaciais e ambientais que precisam ser organizadas para facilitar sua utilização e consulta no monitoramento das espécies. Nesse contexto, este trabalho apresenta o desenvolvimento de um dashboard voltado ao acompanhamento dos ninhos monitorados pela Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque, por meio do projeto Tartarugas ao Mar. A construção da ferramenta foi precedida por uma experiência de imersão em campo, com duração aproximada de um mês, durante a qual foram acompanhadas atividades de monitoramento, identificação e marcação de ninhos e ações de educação ambiental realizadas pela instituição, no município de Maxaranguape, RN. Essa vivência possibilitou entender o fluxo de coleta das informações e as principais demandas relacionadas ao seu acompanhamento. A partir disso, foi elaborada uma plataforma digital capaz de apresentar, em um mapa interativo, a localização dos ninhos e os dados associados a cada registro, incluindo data e horário de identificação e informações referentes à previsão de eclosão. A ferramenta possibilita a consulta dos registros por meio da representação espacial e de mecanismos de busca e filtragem. Dessa maneira, o dashboard constitui uma alternativa para centralizar e facilitar o acesso aos dados produzidos durante o monitoramento, aproximando recursos computacionais das práticas de pesquisa e conservação de tartarugas marinhas

Palavras-chave: tartarugas marinhas; monitoramento ambiental; georreferenciamento.

TITLE: Programming and mobile app design for sea turtle nesting areas

Abstract

Monitoring the reproductive activity of sea turtles generates a set of spatial and environmental data that must be organized to facilitate its use and consultation in the monitoring of these species. In this context, this study presents the development of a

dashboard designed to track the nests monitored by the Cabo de São Roque Association for Environmental Protection and Conservation (APC Cabo de São Roque) through the "Tartarugas ao Mar" project. The development of the tool was preceded by an immersive field experience lasting approximately one month, during which we observed monitoring activities, nest identification and tagging, and environmental education initiatives carried out by the organization in the municipality of Maxaranguape, RN. This experience enabled us to understand the data collection process and the main requirements related to its management. Based on this, a digital platform was developed capable of displaying, on an interactive map, the location of the nests and the data associated with each record, including the date and time of identification and information regarding the predicted hatching date. The tool allows users to consult the records through spatial representation and search and filtering mechanisms. In this way, the dashboard serves as a means to centralize and facilitate access to the data produced during monitoring, integrating computational resources with research and conservation practices of marine turtles.

Keywords: sea turtles; environmental monitoring; georeferencing;

Introdução

As tartarugas marinhas são de grande importância ecológica e alvo de estudos de diversas áreas da biologia, tornando-se objeto de programas de pesquisa e conservação voltados, em grande maioria, ao acompanhamento de suas áreas reprodutivas. O monitoramento das desovas e dos ninhos permite que pesquisadores consigam entender sobre a distribuição espacial e temporal das ocorrências. No Brasil é comumente utilizado por associações de conservação registros sistemáticos de fêmeas, ninhos, datas de postura, nascimento e outros parâmetros reprodutivos para avaliar estratégias reprodutivas e tendências populacionais visando a proteção e conservação (Marcovaldi et al., 2016). A utilidade dessa sistematização das informações também fica evidente com o desenvolvimento de bases de dados específicas para integrar registros relacionados às tartarugas marinhas e apoiar projetos de pesquisas e conservação (Barrios-Garrido; Montiel-Villalobos, 2025).

A Associação de Proteção e Conservação Ambiental Cabo de São Roque (APC Cabo de São Roque) desenvolve ações de pesquisa, conservação e educação ambiental, com destaque para o monitoramento de tartarugas marinhas no litoral do Rio Grande do Norte. Por meio do projeto Tartarugas ao Mar, a instituição realiza o acompanhamento de áreas reprodutivas, ninhos e filhotes, além da coleta de dados relacionados ao ciclo reprodutivo das espécies (Silva et al., 2022). Atualmente, o projeto contempla aproximadamente 60 km de litoral, distribuídos em 15 praias dos municípios de Maxaranguape, Ceará-Mirim, Parnamirim e Nísia Floresta (APC Cabo de São Roque, 2026).

Nesse contexto, o uso de ferramentas digitais para a organização dos dados vem contribuindo com o armazenamento de informações para tornar o monitoramento mais sistemático em relação aos dados obtidos em campo. O uso de sistemas de informação e

bases de dados permite integrar diferentes tipos de registros, enquanto a espacialização das ocorrências possibilita observar sua distribuição geográfica (Wittwer et al., 2022).

Portanto, este presente trabalho teve como objetivo desenvolver um dashboard destinado ao monitoramento de ninhos de tartarugas marinhas acompanhadas pela APC Cabo de São Roque, reunindo informações de localização, data e horário de identificação dos ninhos e dados ambientais obtidos por dispositivos instalados nos locais monitorados.

Metodologia

O sistema foi desenvolvido utilizando a linguagem de programação JavaScript e estruturado para mostrar os registros de maneira espacial e interativa, como uma aplicação web utilizando o framework React em conjunto com o Next.js, com a implementação realizada por meio das linguagens JavaScript e TypeScript. A utilização dessas tecnologias permitiu estruturar a interface da aplicação e implementar os recursos necessários para a apresentação e interação com os dados de monitoramento.

A alimentação do dashboard é realizada por meio de uma API já existente no projeto associado ao aplicativo utilizado para a coleta dos dados. O dashboard utiliza os dados disponibilizados pela API para apresentar as informações na interface, estabelecendo uma comunicação entre os dados produzidos pelo aplicativo e sua visualização na aplicação web. Essa integração permite que os registros utilizados no sistema sejam apresentados de forma organizada, sem a necessidade de inserção manual dos dados diretamente no dashboard.

A interface foi estruturada para apresentar os registros espacialmente por meio de um mapa interativo, no qual os ninhos são representados de acordo com suas respectivas localizações. A aplicação também dispõe de mecanismos de consulta e filtragem, permitindo a seleção dos registros de acordo com informações como praia e estação de monitoramento, além da consulta individual dos ninhos.

Após o desenvolvimento, a aplicação foi disponibilizada na internet por meio da plataforma Vercel, utilizada para realizar o deploy do dashboard. A ferramenta pode ser acessada como uma aplicação web, permitindo a visualização dos dados disponibilizados pela API em uma interface única e interativa.

Os registros presentes no sistema contemplam informações relacionadas à localização dos ninhos, data e horário em que cada ninho foi encontrado e marcado, para a previsão de eclosão. Também são disponibilizadas informações referentes à praia e à estação de monitoramento.

Resultados e Discussões

Como resultado, foi desenvolvido um dashboard web capaz de integrar informações espaciais, temporais e ambientais relacionadas ao monitoramento dos ninhos. A interface da ferramenta apresenta um mapa interativo em que os registros são representados por pontos geográficos indicando exatamente onde aquele ninho está, e contendo todas informações captadas ao passar o cursor por cima, ou pesquisar pelo número do ninho específico.

Figura 1 - Interface principal do dashboard desenvolvido para o monitoramento de ninhos de tartarugas marinhas

Além disso, a ferramenta apresenta também filtros de consulta por praia e estações, facilitando a localização de registros específicos. Portanto, informações diferentes registros de campo são facilmente visualizadas de forma conjunta em uma única interface, ou seja, o registro sistemático das ocorrências reprodutivas está associado aos dados de geolocalização (ICMBIO, 2023). Assim, a representação cartográfica empregada no dashboard possibilita relacionar cada registro às suas respectivas coordenadas geográficas. A ferramenta apresenta potencial para contribuir com a organização de séries de dados ambientais associados aos ninhos, por sua forma de facilitar a visualização dos registros. As informações armazenadas são de grande relevância no acompanhamento da incubação e nas alterações ocorridas no interior e entorno do ninho (Wyneken; Lolavar, 2015; Lolavar; Wyneken, 2017).

A integração dessas informações permite relacionar os registros reprodutivos a localização espacial dos ninhos e as condições ambientais no período, possibilitando que seja observado como se interligam diversos fatores que compõem a período reprodutivos das tartarugas marinhas, como o tempo de incubação, a praia de desova, a espécie de tartaruga e o horário da postura dos ovos. Em aplicações voltadas à biodiversidade marinha, a união desses dados em uma única interface tem sido utilizada para facilitar a consulta e a interpretação de informações vindas de diferentes fontes (Nunez;Buckle; Zarate, 2024).

Ferramentas digitais de organização de dados já se encontram em aplicação em organizações que atuam na conservação da biodiversidade, por apresentarem trabalhos que reúnem diversas informações em diferentes meios, utilizando a aplicação dessas ferramentas para unificar os dados gerados (Panda; Dash; Roy, 2024). Além disso, a ferramenta apresenta também filtros de consulta por praia e estações, facilitando a localização de registros específicos. Portanto, informações diferentes registros de campo são facilmente visualizadas de forma conjunta em uma única interface, ou seja, o registro sistemático das ocorrências reprodutivas está associado aos dados de geolocalização (Nunez;Buckle; Zarate, 2024). Assim, a representação cartográfica empregada no dashboard possibilita relacionar cada registro às suas respectivas coordenadas geográficas. A ferramenta apresenta potencial para contribuir com a organização de séries de dados ambientais associados aos ninhos, por sua forma de facilitar a visualização dos registros. As informações armazenadas são de grande relevância no acompanhamento da incubação e nas alterações ocorridas no interior e entorno do ninho (Wyneken; Lolavar, 2015; Lolavar; Wyneken, 2017).

A integração dessas informações permite relacionar os registros reprodutivos a localização espacial dos ninhos e as condições ambientais no período, possibilitando que seja observado como se interligam diversos fatores que compõem a período

reprodutivos das tartarugas marinhas, como o tempo de incubação, a praia de desova, a espécie de tartaruga e o horário da postura dos ovos. Em aplicações voltadas à biodiversidade marinha, a união desses dados em uma única interface tem sido utilizada para facilitar a consulta e a interpretação de informações vindas de diferentes fontes (Nunez;Buckle; Zarate, 2024).

Ferramentas digitais de organização de dados já se encontram em aplicação em organizações que atuam na conservação da biodiversidade, por apresentarem trabalhos que reúnem diversas informações em diferentes meios, utilizando a aplicação dessas ferramentas para unificar os dados gerados (Panda; Dash; Roy, 2024). No contexto da APC Cabo de São Roque, a ferramenta desenvolvida irá contribuir para sistematização dos dados produzidos durante as atividades de monitoramento. A organização e padronização dessas informações são etapas essenciais para que os dados das ocorrências possam ser utilizados de forma efetiva nas ações de monitoramento e conservação (Coetzer et al., 2023). Pois são registros produzidos em grande volume e, apesar de padronizados, podem estar distribuídos em diferentes fontes de informação.

Nesse sentido, o dashboard pode ser compreendido não apenas como uma ferramenta de visualização, mas como um recurso de apoio à sistematização dos dados de monitoramento, uma vez que possibilita o acesso conjunto a informações que acompanham diferentes etapas do período reprodutivo das tartarugas marinhas. Sua utilização pode ajudar na identificação de padrões espaciais e temporais, o acompanhamento das condições associadas aos ninhos e a organização do histórico dos registros. No contexto da APC Cabo de São Roque, a ferramenta desenvolvida irá contribuir para sistematização dos dados produzidos durante as atividades de monitoramento. A organização e padronização dessas informações são etapas essenciais para que os dados das ocorrências possam ser utilizados de forma efetiva nas ações de monitoramento e conservação (Coetzer et al., 2023). Pois são registros produzidos em grande volume e, apesar de padronizados, podem estar distribuídos em diferentes fontes de informação.

Portanto, o dashboard pode ser compreendido não apenas como uma ferramenta de visualização, mas como um recurso de apoio à sistematização dos dados de monitoramento, uma vez que possibilita o acesso conjunto a informações que acompanham diferentes etapas do período reprodutivo das tartarugas marinhas. Sua utilização pode ajudar na identificação de padrões espaciais e temporais, o acompanhamento das condições associadas aos ninhos e a organização do histórico dos registros. A ferramenta estabelece uma conexão entre a produção de dados em campo e sua utilização posterior, aumentando as possibilidades de organização das informações no contexto das ações de pesquisa e conservação realizadas pela APC Cabo de São Roque.

Conclusão

A produção do dashboard mostrou a importância do conhecimento obtido em campo e a aplicação de recursos tecnológicos voltados à conservação da biodiversidade. Evidenciou que o futuro dos projetos ambientais está em parceria com a tecnologia. A

experiência demonstrou que ferramentas computacionais também podem contribuir para o avanço do processo de monitoramento, deixando-o mais acessível e sistematizado.

Para além da contribuição tecnológica,a experiência proporcionou uma compreensão mais aprofundada das etapas envolvidas no monitoramento das tartarugas marinhas, ressaltando a importância da coleta contínua e organizada de dados para o acompanhamento dos eventos reprodutivos. Assim, a experiência de iniciação científica contribuiu tanto para o aprimoramento da ferramenta quanto para a formação científica e prática no contexto da conservação da biodiversidade.

Referências

APC CABO DE SÃO ROQUE. Tartarugas ao Mar. [S. l.]: APC Cabo de São Roque, 2026. Disponível em:https://apccabodesaoroque.com.br/tartarugas-ao-mar/. Acesso em: 20 ago. 2026.

FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR. Sistema de Informações sobre Tartarugas Marinhas – SITAMAR. 20 mar. 2023. Disponível em: [inserir URL]. Acesso em: 20 ago. 2026.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio).Manual para conservação das tartarugas marinhas. Brasília, DF: ICMBio, 2023. Disponível em: [inserir URL]. Acesso em: 20 ago. 2026.

LOLAVAR, Alexandra; WYNEKEN, Jeanette. Experimental assessment of the effects of moisture on loggerhead sea turtle hatchling sex ratios. Zoology, v. 123, p. 64–70, 2017. DOI:https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.06.007.

MARCOVALDI, Maria Ângela; THOMÉ, João Carlos A.; BELLINI, Claudio; SILVA, Augusto César C. D. da; SANTOS, Armando J. B.; LIMA, Eduardo H. S. M.; FEITOSA, Ricardo S. C.; GOLDBERG, Daphne; LOPEZ, Gustave; MARCOVALDI, Guy. A conservação e pesquisa das tartarugas marinhas no Nordeste brasileiro pelo Projeto Tamar. In: CORREIA, Jozélia Maria de Sousa; SANTOS, Ednilza Maranhão dos; MOURA, Geraldo Jorge Barbosa de (org.). Conservação de tartarugas marinhas no Nordeste do Brasil: pesquisas, desafios e perspectivas. Recife: Editora Universitária da UFRPE, 2016. p. 15–50.

NEVES-FERREIRA, Isabella; MELLO-FONSECA, Juliana; FERREIRA, Carlos E. L. Photo-identification shows the spatio-temporal distribution of two sea turtle species in a Brazilian developmental foraging ground. Marine Biology, v. 170, n. 7, p. 83, 2023. DOI:https://doi.org/10.1007/s00227-023-04226-z.

NUÑEZ, Gustavo Marcelo; BUCKLE, Carlos Ezequiel; ZÁRATE, Marcos Daniel. ODP-DASHBOARD: enhancing marine species conservation in the South Atlantic through linked open data integration. Journal of Computer Science & Technology, v. 24, n. 2, p. 182–192, 2024. DOI:https://doi.org/10.24215/16666038.24.e17.

PANDA, Rajendra Mohan; DASH, Padmanava; ROY, Partha Sarathi. A novel web-based approach for monitoring biodiversity. Ecology and Evolution, v. 14, e70364, 2024. DOI:https://doi.org/10.1002/ece3.70364.

SILVA, Lucas Gabriel Veríssimo Pinheiro da; BARRETO, Isadora Natália Rocha; ARAÚJO, Jury Gabriel Amorim de; GONÇALO, Bruna da Silva; SANTOS, Jully Kalyanny Silva; OLIVEIRA, Yasmin Silva de; SILVA, Ana Gabrielly Soares da; NAVONI, Julio Alejandro. Breve histórico institucional e atuação da instituição na conservação de tartarugas marinhas. In: FUNDAÇÃO PROJETO TAMAR. Educação ambiental para conservação de tartarugas marinhas no Nordeste do Brasil. [S. l.]: Fundação Projeto Tamar, 2022. p. 27–30.

SPEAR, Dian; VAN WILGEN, Nicola J.; REBELO, Anthony G.; BOTHA, Judith M. Collating biodiversity occurrence data for conservation. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 11, 1037282, 2023. DOI:https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1037282.

VIEIRA, D. H. G.; SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C. Importância de áreas-índex nos estudos de longo prazo sobre tartarugas marinhas: o exemplo do Projeto Tamar no litoral sul do Rio Grande do Norte. In: SIMPÓSIO DE TARTARUGAS MARINHAS, 1., 2017. Anais […]. [S. l.]: Projeto Tamar, 2017.

WYNEKEN, Jeanette; LOLAVAR, Alexandra. Loggerhead sea turtle environmental sex determination: implications of moisture and temperature for climate change based predictions for species survival. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, v. 324, n. 3, p. 295–314, 2015. DOI:https://doi.org/10.1002/jez.b.22620.

Anexos



Figura 1 - Interface principal do dashboard desenvolvido para o monitoramento de ninhos de tartarugas marinhas

CÓDIGO: ET1402

AUTOR: MARIA LORENA PESSOA BATISTA

ORIENTADOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

TÍTULO: Contaminação por nutrientes e estado trófico nos Parrachos de Rio do Fogo - Rio Grande do Norte

Resumo

Os ecossistemas recifais apresentam importantes funções ecológicas e socioeconômicas, mas estão sujeitos ao aporte de nutrientes provenientes de fontes continentais e atividades antrópicas. Este estudo avaliou a distribuição espaço-temporal de nutrientes inorgânicos dissolvidos, clorofila-a e razões estequiométricas nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, buscando identificar enriquecimento nutricional. Foram realizadas seis campanhas entre maio de 2024 e maio de 2025, com amostragens no Córrego e nos Parrachos. Analisaram-se nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, ortofosfato, silicato e clorofila-a. Os resultados indicaram maior disponibilidade de silicato no Córrego, com concentrações de até 127,4 µmol/L. Nos Parrachos, foram observados valores de até 42,0 µmol/L para nitrato e 52,8 µmol/L para nitrogênio amoniacal. A clorofila-a apresentou maiores concentrações no Córrego, especialmente em março e maio de 2025. As razões estequiométricas evidenciaram diferenças na disponibilidade relativa de nitrogênio, fósforo e silicato, com predominância de amostras dos Parrachos sob limitação relativa de silicato e fósforo. A comparação com a Resolução CONAMA nº 357/2005 indicou ocorrências pontuais acima dos valores de referência para nitrato e nitrogênio amoniacal nos Parrachos. Os resultados sugerem influência de fontes continentais e processos internos de reciclagem, reforçando a importância do monitoramento contínuo da qualidade da água.

Palavras-chave: Recifes de coral; Nutrientes; Eutrofização; Clorofila-a

TITLE: Nutrient Contamination and Trophic Status in the Rio do Fogo Reefs – Rio Grande do Norte, Brazil

Abstract

Coral reef ecosystems perform important ecological and socioeconomic functions but are subject to nutrient inputs from continental sources and anthropogenic activities. This

study evaluated the spatiotemporal distribution of dissolved inorganic nutrients, chlorophyll-a, and stoichiometric ratios in the Rio do Fogo reefs, Rio Grande do Norte, Brazil, aiming to identify nutrient enrichment. Six sampling campaigns were conducted between May 2024 and May 2025, with samples collected from the stream and reef environments. Nitrate, nitrite, ammoniacal nitrogen, orthophosphate, silicate, and chlorophyll-a were analyzed. The results indicated greater silicate availability in the stream, with concentrations reaching 127.4 µmol/L. In the reefs, concentrations reached 42.0 µmol/L for nitrate and 52.8 µmol/L for ammoniacal nitrogen. Chlorophyll-a concentrations were higher in the stream, particularly in March and May 2025. Stoichiometric ratios revealed differences in the relative availability of nitrogen, phosphorus, and silicate, with most reef samples showing relative limitation by silicate and phosphorus. Comparison with CONAMA Resolution No. 357/2005 indicated isolated exceedances of reference values for nitrate and ammoniacal nitrogen in the reefs. The results suggest an influence of continental sources and internal nutrient recycling processes, reinforcing the importance of continuous monitoring of water quality.

Keywords: Coral reef ecosystems; Dissolved inorganic nutrients; Eutrophication;

Introdução

Os ecossistemas marinhos, especialmente os recifes de corais formados por estruturas biogênicas de carbonato de cálcio, abrigam vasta biodiversidade e atuam como habitats e berçários vitais que sustentam atividades como pesca e turismo (McKinney, 1998; Principe et al., 2011). Esses ecossistemas fornecem quatro categorias essenciais de serviços: (1) Provisão de alimentos e materiais para uso direto; (2) Regulação por processos ecológicos como o sequestro de carbono; (3) Culturais, comoturismo, recreação e o senso de identidade das comunidades costeiras; e (4) Suporte atravé da manutenção da produção primária e da diversidade genética (Hassan et al., 2005).

A base de toda essa teia trófica e dos serviços ecossistêmicos é a produção primária, conduzida por organismos como o fitoplâncton (Hassan et al., 2005). Esse processo demanda a assimilação de nutrientes inorgânicos dissolvidos, destacando-se o nitrogênio, o fósforo e o silício, cuja disponibilidade equilibrada é indispensável para a manutenção saudável do ecossistema marinho (Bell, 1992; Ezzat et al., 2015). O silício possui importância particular para organismos silicificantes, como as diatomáceas. A estequiometria ideal para a composição do plâncton é guiada pela proporção de Redfield (106C:16N:1P), que atua como referência biogeoquímica global, embora sofra variações naturais dependendo do grupo biológico e das condições ambientais (Wolf-Gladrow; Klaas, 2024). A razão de Redfield é bastante utilizada como referência para avaliar o enriquecimento relativo nitrogênio e fósforo e fatores que controlam a variabilidade da clorofila-a no sistema, ou seja, crescimento do fitoplâncton (Redfield, 1934; Redfield et al., 1963).

No entanto, o crescimento populacional e as atividades antrópicas têm provocado o descarte inadequado de resíduos, como esgoto doméstico e industrial, fertilizantes agrícolas e queima de combustíveis, resultando no enriquecimento artificial de nitrogênio e fósforo no mar (Esteves, 1999; Boyer et al., 2002; U.S. Environmental Protection Agency, 2012). Esse enriquecimento excessivo de nutrientes pode

desencadear o processo de eutrofização, caracterizado pelo aumento da produtividade primária e pela proliferação excessiva de algas na água. Nos ambientes recifais, esse aporte excessivo altera drasticamente a estrutura da comunidade biológica,favorecendo a proliferação e competição de organismos não construtores, como as macroalgas, em detrimento dos corais pétreos (Diaz Ortega; Hernandez, 2014). Além de favorecer grupos oportunistas e alterar a composição da comunidade fitoplanctônica, Além do desequilíbrio na teia fitoplanctônica e da redução na transparência da água, a eutrofização eleva a densidade de outros grupos nãos construtores, como ouriços-do-mar e esponjas, culminando na supressão de corais zooxantelados e na perda generalizada de biodiversidade (Costa et al., 2000; Ferrier-Pagès et al., 2000).

Com base nesse contexto, este trabalho visa avaliar a distribuição espaço-temporal de nutrientes inorgânicos dissolvidos, suas razões estequiométricas e níveis de clorofila-a, como forma de identificar possíveis eventos de eutrofização nos ecossistemas recifais dos parrachos de Rio do Fogo - RN.

Metodologia

Área de estudo

O estudo foi realizado nos Parrachos de Rio do Fogo, situado no município de Rio do Fogo/RN (Figura 1), o qual encontra-se inserido na bacia hidrográfica do rio Punaú (Beltrão et al., 2005). A bacia possui área de drenagem de 447,9 km2 e vazão média de 3,167 m3/s. Destaca-se também a presença de aquíferos na região (IGARN, 1998), como fontes potenciais de entrada de água doce subterrânea para o ambiente marinho. A atividade agrícola constitui a principal forma de uso e ocupação do solo da bacia, com destaque para os cultivos de banana, caju, coco, cana-de-açúcar, manga, tomate e jerimum (Silveira, 2009). O sistema de saneamento da região é incipiente, marcado pela ausência de rede geral de esgoto e pluvial e esgotamento sanitário realizado essencialmente por fossas rudimentares e sépticas (IBGE, 2010). Assim, as atividades agrícolas e urbanas da região constituem fontes potenciais de contaminantes, incluindo o aporte de nutrientes para os recursos hídricos continentais e marinhos.

Procedimentos de amostragem

As medições e coletas de amostras de água foram realizadas durante expedições bimestrais, contemplando períodos secos e chuvosos. O cronograma de amostragem compreendeu as campanhas realizadas em maio, agosto e novembro de 2024, janeiro, março e maio de 2025. As amostras foram coletadas em dois ambientes: no Córrego (Figura 2) localizado na área continental adjacente aos Parrachos, e na porção superficial da água sobre os Parrachos de Rio do Fogo (Figura 3). Em ambos os ambientes, foram coletadas amostras de água superficial para determinação dos nutrientes inorgânicos dissolvidos e clorofila-a, sendo as variáveis físico-químicas, temperatura, pH e salinidade, medidas em campo com equipamento multiparâmetros.

Alíquotas de 1000 mL de água do mar foram armazenadas em frascos de polietileno para posterior processamento e análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos, incluindo nitrato, nitrito, N-amoniacal, ortofosfato e silicato, além de clorofila-a. Todo o material

utilizado foi previamente descontaminado com solução de HCl 10% e água destilada e deionizada.

As amostras foram filtradas imediatamente após o desembarque, utilizando membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm em sistema de filtração a vácuo. O filtrado foi mantido congelado até o momento da determinação dos nutrientes inorgânicos dissolvidos. Os nutrientes ortofosfato, nitrito, nitrato, N-amoniacal e silicato foram analisados por colorimetria/espectrofotometria, de acordo com os métodos descritos por Grasshoff et al. (1999). Para o nitrato, foi realizada redução a nitrito em coluna de cádmio, com leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS nos comprimentos de onda de 810 nm para ortofosfato, 543 nm para nitrito e nitrato e 630 nm para N-amoniacal.

Para a análise de clorofila-a, as amostras foram filtradas até o ponto de saturação da membrana e os filtros foram congelados para posterior análise. Os pigmentos foram extraídos em acetona 90% por 24 horas, sob refrigeração e ao abrigo da luz, seguindo os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Posteriormente, o extrato foi submetido à centrifugação e analisado no espectrofotômetro UV-VIS. A determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos foi realizada pelo método monocromático de Lorenzen (1967).

Por fim, os níveis encontrados para os parâmetros avaliados foram comparados aos limites estabelecidos pela legislação vigente para águas salinas (CONAMA 357/2005). Os dados hidrológicos foram compilados a partir do sistema da Agência Nacional de Águas (ANA), com o objetivo de avaliar a influência da pluviosidade e da vazão fluvial sobre a variação sazonal da qualidade da água nos ecossistemas estudados.

Análise e tratamento dos dados

As relações estequiométricas entre os nutrientes dissolvidos inorgânicos nitrogênio (DIN), fósforo (DIP) e silicato (DSi) foi avaliada a partir das razões DIN:DIP e DIN:DSi plotadas em gráfico de dispersão. As razões foram representadas em escala logarítmica, possibilitando a visualização dos dados ao longo de diferentes ordens de magnitude. As amostras foram diferenciadas por ambiente de coleta, sendo o córrego (stream) representado em azul e os parrachos (reef) em vermelho, permitindo a comparação das razões estequiométricas entre os dois ambientes. A interpretação do gráfico foi baseada nas relações estequiométricas entre os nutrientes, tendo como referência as razões estequiométricas de Redfield (Redfield, 1958). No gráfico, essa relação é representada pela linha vertical em DIN:DIP = 16. Para também incorporar a relação com o silicato ao diagrama, foi utilizada adicionalmente uma linha horizontal em DIN:DSi = 1, estabelecendo uma referência para a relação entre nitrogênio e silicato. O uso conjunto dessas referências permitiu avaliar, no mesmo diagrama, a disponibilidade relativa de DIN, DIP e DSi e interpretar a distribuição das amostras nas diferentes regiões do gráfico. O cruzamento das referências DIN:DIP = 16 e DIN:DSi = 1 estabelece quatro regiões gráficas, identificadas pelos rótulos “DSi limited”, “DSi and DIP limited”, “DIN limited” e “DIP limited”, representando diferentes condições de disponibilidade relativa dos nutrientes. A posição das amostras em relação às razões de referência permite avaliar desvios da composição estequiométrica esperada e identificar padrões de possível limitação relativa de N, P e Si entre as regiões de coleta.

A distribuição temporal das variáveis químicas foi analisada utilizando modelos lineares mistos (LMM), com expedição como efeito fixo e estação de amostragem como efeito aleatório, permitindo controlar a dependência entre observações da mesma estação. As análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2023), utilizando os pacotes lme4 para ajuste dos modelos, lmerTest para testes de significância dos efeitos fixos e emmeans para comparações múltiplas post-hoc, com

Resultados e Discussões

Clorofila-a

As concentrações de clorofila-a apresentaram diferenças marcantes entre o Córrego e as estações dos parrachos, com valores mais elevados no Córrego durante as campanhas de março e maio de 2025, quando foram registrados máximos de 6,76 e 7,03 mg/L, respectivamente (Figura 1). A clorofila-a é amplamente utilizada como indicador da biomassa fitoplanctônica e pode ser empregada como um indicador indireto do estado trófico e de processos de eutrofização em ambientes costeiros, uma vez que o enriquecimento por nutrientes pode estimular o crescimento do fitoplâncton (Smith, 2006; Schaffelke et al., 2012). Nesse sentido, os maiores valores observados no Córrego em março e maio de 2025 podem estar relacionados à maior disponibilidade de nutrientes observada nesse ambiente, especialmente para o ortofosfato, que apresentou maiores concentrações em março e maio de 2025. Esse comportamento sugere uma possível resposta da biomassa fitoplanctônica à disponibilidade de nutrientes na coluna d'água. Em contraste, os Parrachos apresentaram concentrações relativamente menores de clorofila-a, com máximo de 1,76 mg/L em novembro de 2024 e valores inferiores a 1,15 mg/L nas demais campanhas. É importante notar que não se observou uma associação entre o aumento de nutrientes e o aumento da clorofila-a. Uma das explicações para essa ocorrência é que a assimilação de nutrientes por outros produtores primários, como as macroalgas e as zooxantelas, pode restringir a disponibilidade para o fitoplâncton. Isso cria uma competição por nutrientes entre diferentes grupos, como fitoplâncton e macroalgas, um fator crucial para a saúde dos recifes de coral (Larkum; Steven, 1994; Larned, 1998). Outra possível explicação seria o desequilíbrio nas proporções estequiométricas definidas pela Relação de Redfield, que descreve a proporção média dos elementos C:N:P (106:16:1) necessária para o crescimento equilibrado do fitoplâncton. Quando essa razão não é atendida, por exemplo, havendo excesso de nitrogênio em relação ao fósforo ou vice-versa a assimilação dos nutrientes pode ser limitada, restringindo o aumento da biomassa fitoplanctônica. Além disso, mesmo sob condições de relativa estabilidade da proporção de Redfield nos oceanos, diferentes espécies de fitoplâncton apresentam flexibilidade nas suas exigências nutricionais, variando em resposta a qual nutriente se encontra em maior limitação, o que ajuda a explicar desvios entre nutrientes disponíveis e produção primária observada em recifes (Geider; La Roche, 2011).

Esse padrão é compatível com a condição geralmente oligotrófica dos ambientes recifais, nos quais a disponibilidade de nutrientes tende a ser limitada e a biomassa fitoplanctônica permanece relativamente baixa. Estudos realizados em ambientes recifais demonstram que concentrações de nutrientes e clorofila-a podem ser maiores em áreas costeiras sujeitas a maior influência continental, enquanto recifes menos

influenciados por fontes terrestres tendem a apresentar menores concentrações (Costa Jr. et al., 2007; Guo et al., 2019).

Ortofosfato

As concentrações de ortofosfato apresentaram valores variados entre os ambientes amostrados. Nos Parrachos, foram observadas concentrações máximas de 0,28 µmol/L, sendo o maior valor registrado em novembro de 2024. No Córrego, as concentrações alcançaram máximo de 0,8 µmol/L em março de 2025 e de 0,6 µmol/L em novembro de 2024 (Figura 2). Esse comportamento pode estar relacionado à dinâmica do fósforo durante sua transferência entre ambientes continentais e marinhos, uma vez que o fosfato dissolvido pode interagir com partículas minerais por processos de adsorção e dessorção, influenciando sua disponibilidade na coluna d'água (Froelich, 1988). Além disso, o fósforo pode ser removido da coluna d'água por assimilação pelos produtores primários e posteriormente transportado para os sedimentos, onde pode ser retido por processos de adsorção e sedimentação (Benitez-Nelson, 2000). Dessa forma, a diferença observada entre o Córrego e os Parrachos pode indicar que parte do ortofosfato presente no ambiente continental permanece com baixa disponibilidade na coluna d'água após sua entrada no ambiente recifal.

Nitrato

As concentrações de nitrato apresentaram variação espaço-temporal entre os ambientes amostrados. No Córrego, foi observado o valor máximo de 11,5 µmol/L em novembro de 2024, seguido por uma redução nas campanhas subsequentes, atingindo valores entre 0,2 e 0,9 µmol/L em maio de 2025. Nos Parrachos, as concentrações permaneceram relativamente menores durante as campanhas de 2024 e janeiro de 2025, porém apresentaram aumento expressivo a partir de março de 2025, quando foram registrados valores de até 42,0 µmol/L. Em maio de 2025, embora tenha ocorrido redução em relação à campanha anterior, as concentrações permaneceram elevadas, com valores de até 26,4 µmol/L (Figura 3). O nitrato constitui uma das principais formas inorgânicas de nitrogênio disponíveis no ambiente marinho e pode ser formado durante o processo de nitrificação, no qual o amônio é oxidado inicialmente a nitrito e, posteriormente, a nitrato em condições oxigenadas (Sarmiento; Gruber, 2006). Nesse contexto, a elevada concentração observada nos Parrachos em março de 2025, pode estar relacionada à disponibilidade de nitrogênio proveniente de diferentes fontes e processos no ambiente. Entre as possíveis fontes, destaca-se o aporte de nutrientes associado ao esgoto doméstico, uma vez que a descarga de águas residuárias pode contribuir para o enriquecimento de ambientes costeiros com matéria orgânica e compostos nitrogenados, por meio do escoamento superficial, descarga fluvial e descarga subterrânea (Zhang et al., 2022). Essa possibilidade é particularmente relevante para a área de estudo, considerando a precariedade do saneamento básico no município de Rio do Fogo, que pode favorecer a entrada de nutrientes nos sistemas costeiros. Além das fontes externas, a reciclagem interna de nutrientes também pode contribuir para a disponibilidade de nitrogênio nos recifes. A degradação da matéria orgânica por microrganismos, especialmente bactérias heterotróficas, promove a remineralização do nitrogênio orgânico e a liberação de formas inorgânicas de nitrogênio, como o amônio, que pode posteriormente ser convertido em nitrito e nitrato por meio da nitrificação. Nesse processo, a matéria orgânica proveniente da atividade dos organismos recifais constitui uma importante fonte de nitrogênio para a reciclagem interna. Os peixes também

participam desse processo por meio da excreção de compostos nitrogenados, principalmente amônio, contribuindo para a disponibilização desse nutriente no ambiente (Meyer et al., 1983; Allgeier et al., 2016). Além das fontes antrópicas, a reciclagem interna de nutrientes também pode contribuir para a disponibilidade de nitrogênio nos recifes. Os peixes desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes nesses ambientes, liberando compostos nitrogenados, principalmente amônio, por meio da excreção, que pode posteriormente ser transformado por processos de nitrificação e contribuir para a formação de nitrato (Meyer et al., 1983; Allgeier et al., 2016). Assim, o aumento do nitrato observado nos Parrachos pode refletir a atuação conjunta de fontes externas de nutrientes e processos internos de reciclagem, embora a contribuição relativa de cada mecanismo não possa ser determinada a partir dos dados obtidos neste estudo.

Nitrito

As concentrações de nitrito apresentaram baixa variação entre os ambientes e campanhas amostrais, com valores de 0,0 e 0,5 µmol/L. No Córrego, o maior valor (0,5 µmol/L) foi observado em novembro de 2024, janeiro e março de 2025, enquanto nos Parrachos a concentração máxima também foi de 0,5 µmol/L, registrado em janeiro de 2025 (Figura 4). A baixa concentração de nitrito observada nos dois ambientes pode estar relacionada à sua condição de composto intermediário no ciclo do nitrogênio, sendo rapidamente convertido durante os processos de nitrificação. Em ambientes marinhos oxigenados, o nitrito pode ser formado durante a oxidação do amônio e posteriormente oxidado a nitrato, fazendo com que sua permanência na coluna d'água seja relativamente curta. Dessa forma, os baixos valores registrados neste estudo podem indicar que o nitrito apresentou comportamento predominantemente transitório, com rápida transformação para outras formas nitrogenadas, especialmente o nitrato (Ward, 2008).

N-amoniacal

As concentrações de nitrogênio amoniacal apresentaram elevada variação espaço-temporal entre os ambientes amostrados. No Córrego, foram observadas baixas concentrações nas campanhas de maio e agosto de 2024, seguidas por um aumento expressivo a partir de novembro de 2024, quando os valores atingiram 9,7 µmol/L. A maior concentração registrada no Córrego ocorreu em janeiro de 2025, com 23,9 µmol/L, seguida por uma redução nas campanhas de março e maio de 2025, quando os maiores valores registrados foram de 3,0 e 5,1 µmol/L, respectivamente (Figura 5). Na região de Rio do Fogo, o período chuvoso ocorre entre março e junho, com intensificação das precipitações entre abril e junho (Diniz; Pereira, 2015). Dessa forma, a variação observada entre as campanhas pode estar relacionada às diferenças nas condições pluviométricas e aos processos de entrada e diluição de nutrientes nos ambientes estudados (Guimarães; Mello, 2006). Durante períodos de maior precipitação, o aumento do escoamento superficial pode favorecer o transporte de nutrientes e matéria orgânica provenientes da bacia de drenagem para os ambientes aquáticos, enquanto a maior entrada de água pode, por outro lado, promover a diluição das concentrações presentes na coluna d'água. Nos Parrachos, observou-se maior variabilidade entre as campanhas, com concentrações de até 52,8 µmol/L em maio de 2024, enquanto em agosto de 2024 os valores foram iguais a zero. Nas campanhas seguintes, foram registrados valores de até 27,4 µmol/L em janeiro de 2025 e 29,7

µmol/L em maio de 2025. A urbanização acelerada e não planejada, caracterizada pelo uso irregular e indiscriminado de fossas sépticas foram levantados como os principais processos relacionados à contaminação do lençol freático com nutrientes e patógenos, que então se direcionam para os recifes costeiros (Costa Jr. et al., 2000). A partir dos dados do censo do IBGE de 2010, é possível constatar a problemática da falta de saneamento básico do município de Rio do Fogo/RN. O mesmo apresenta um total de 2.568 domicílios, onde quase 94% dos domicílios utilizam fossa rudimentar, uma forma de saneamento que não oferece tratamento adequado e representa um risco de contaminação para o solo e os aquíferos locais. Em contraste, a porcentagem de domicílios com saneamento adequado (fossa séptica ou rede geral) é extremamente baixa, inferior a 1%.

Silicato

As concentrações de silicato apresentaram variação espaço-temporal entre os ambientes amostrados, com valores geralmente mais elevados no Córrego em comparação aos Parrachos (Figura 7). O silício é um nutriente importante para as diatomáceas, entre outros organismos que utilizam desse composto para sua estrutura esquelética. Na ausência de Si, os organismos fitoplanctônicos apresentam estruturas frágeis, anomalias no crescimento, desenvolvimento entre outros prejuízos (Epstein, 1999). No Córrego, as concentrações variaram de 0,9 a 127,4 µmol/L, com aumento expressivo entre novembro de 2024 e janeiro de 2025, quando foram registrados valores de até 50,5 e 127,4 µmol/L, respectivamente. Após esse período, observou-se redução das concentrações em março de 2025, com valores entre 8,3 e 18,5 µmol/L, seguida de novo aumento em maio de 2025, quando foram registrados valores de até 59,5 µmol/L. As cidades têm como característica a presença de sistemas hidrológicos com entrada de silício. Os rios possuem grandes concentrações de silício, já em áreas recifais, a tendência é de que o nível de Si decaia (Bastos; Braga, 2018). Nos Parrachos, as concentrações foram predominantemente inferiores às observadas no Córrego, variando de 0,9 a 24,4 µmol/L ao longo das campanhas, com aumento da amplitude dos valores principalmente em março e maio de 2025.

Razão de Redfield

A análise das razões estequiométricas entre os nutrientes indicou diferenças na disponibilidade relativa de nitrogênio, fósforo e silicato entre os ambientes estudados. Os valores de DIN:DIP inferiores a 16 podem indicar uma maior disponibilidade relativa de fósforo em relação ao nitrogênio, sugerindo potencial limitação por nitrogênio, enquanto valores superiores a 16 indicam maior disponibilidade relativa de nitrogênio e possível limitação por fósforo (Figura 8). Porém, essa interpretação deve ser considerada como um indicativo do balanço entre os nutrientes, e não como uma confirmação de limitação nutricional, uma vez que a limitação do crescimento depende também da disponibilidade absoluta dos nutrientes, da fisiologia dos organismos e das condições ambientais (Howarth, 1988).

Nos ambientes estudados, nota-se que houve um grande número de amostras dos Parrachos (no gráfico iremos chamar de “REEF”) concentrada no quadrante onde o “DSi and DIP limited”, com isso houve uma co-limitação entre silício e fósforo indicando que existe uma abundância relativa de nitrogênio (DIN) em comparação ao P (fósforo) e Si (silicato). O crescimento fitoplâncton nessa área está sendo contido pela

falta de DSi e DIP. Nas águas do Córrego, houve uma assinatura bastante distinta dos Parrachos (no gráfico denomina-se de “STREAM”), percebe-se que os pontos referentes às amostras do córrego estão em maior número abaixo da linha de limitação por silicato, dividindo-se entre “DIN limited” e “DIP limited”. Os sistemas urbanos podem contribuir significativamente para o transporte de silício dissolvido, identificando o esgoto, a infiltração de água subterrânea e o escoamento superficial como importantes fontes de DSi para sistemas de tratamento de águas residuais (Maguire; Fulweiler, 2016). Então existem diversos fatores para esse nível de nutriente ser relativamente maior em comparação ao outro ambiente estudado. No entanto, nessa mesma água analisada ocorre uma deficiência relativa de nitrogênio ou fósforo em relação à quantidade de silicato presente.

Correlação entre as variáveis

Em relação a correlação entre as variáveis vale destacar as interações significativas, tendo nutrientes interagindo negativamente com a salinidade, além da correlação negativa entre pH e concentrações de nutrientes. A relação negativa entre nutrientes e salinidade sugere o aporte de nutrientes via continental, principalmente compostos nitrogenados e silício, conforme evidenciado pelos resultados da variação temporal.

A correlação negativa entre pH e nutrientes em recifes de corais sugere que o enriquecimento nutricional pode contribuir para a acidificação local. Estudos indicam que a decomposição da matéria orgânica liberada por esse enriquecimento eleva a respiração microbiana, resultando na liberação de CO2 e subsequente redução do pH da água (Silbiger et al., 2018). Além disso, experimentos de adição de nutrientes demonstraram aumento na variabilidade do pH local, impactando negativamente processos como fotossíntese e calcificação dos corais (Kerlin et al., 2025). Assim, os Parrachos estão sujeitos ao aporte continental de nutrientes e matéria orgânica, especialmente nos períodos chuvosos e de alta temporada turística. Essas entradas alóctones podem alterar as condições químicas da água do mar, especialmente em relação à redução do pH e da disponibilidade de carbonatos nesses episódios, com possíveis prejuízos à calcificação pelos corais.

Comparação com os padrões de qualidade da água (CONAMA 357/2005)

Em relação à comparação com os padrões de qualidade da água estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005, os resultados obtidos no Córrego indicaram que as concentrações dos nutrientes analisados permaneceram abaixo dos limites estabelecidos para águas doces de Classe 2, considerando os valores de referência adotados para a avaliação. Apesar disso, foram observados aumentos pontuais nas concentrações de nitrato e nitrogênio amoniacal, especialmente em novembro de 2024 e janeiro de 2025, respectivamente, indicando períodos de maior disponibilidade de compostos nitrogenados no ambiente. Esses aumentos podem estar relacionados à dinâmica sazonal e à influência de fontes continentais, sendo o escoamento superficial e a possível contribuição de águas subterrâneas mecanismos que podem favorecer o aporte de nutrientes para o Córrego. Embora a contribuição das águas subterrâneas não tenha sido diretamente avaliada neste estudo, essa hipótese pode ser considerada como uma possibilidade a ser investigada em estudos futuros. Dessa forma, embora os valores registrados não indiquem, de acordo com os limites utilizados, uma condição de não

conformidade generalizada, a ocorrência de picos de nutrientes reforça a necessidade de monitoramento contínuo do ambiente.

Por outro lado, nos Parrachos, a comparação com os padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para águas salinas de Classe 1 demonstrou que as concentrações de nitrito, nitrato e nitrogênio amoniacal apresentaram comportamentos distintos ao longo das campanhas. Embora os valores tenham permanecido abaixo dos limites legais em grande parte das campanhas, foram observadas concentrações de nitrato que ultrapassaram o valor de referência estabelecido para águas salinas de Classe 1, especialmente em março de 2025, quando foram registrados valores de até 42,0 µmol/L. O nitrogênio amoniacal também apresentou valores elevados em algumas campanhas, superando os limites correspondentes à classe de enquadramento em maio de 2024. Em relação à clorofila-a, a resolução estabelece valores de referência para determinadas classes de águas doces, mas não apresenta um padrão específico para águas salinas de Classe 1. Assim, os resultados obtidos nos Parrachos não indicam, de forma geral, uma condição de alteração generalizada da qualidade da água, mas os episódios de maior concentração de nutrientes, especialmente de nitrato e nitrogênio amoniacal, evidenciam a ocorrência de períodos de enriquecimento que justificam a continuidade do monitoramento do ambiente recifal.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que o Córrego constitui um ambiente de maior influência continental e apresentou maior disponibilidade de nutrientes em determinadas campanhas, enquanto os Parrachos apresentaram, em geral, menores concentrações, mas também demonstraram episódios de enriquecimento, particularmente para nitrato e nitrogênio amoniacal. Os resultados reforçam a importância do monitoramento contínuo desses ambientes, considerando a influência das condições climáticas, das fontes continentais e das atividades desenvolvidas na região costeira. O acompanhamento da dinâmica dos nutrientes e da clorofila-a é fundamental para identificar possíveis alterações na qualidade da água e compreender os processos que podem influenciar a manutenção das condições ambientais dos ecossistemas recifais de Rio do Fogo.

Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. Washington, DC: APHA-AWWA-WEF, 2005.

BASTOS, A. T. C. C.; BRAGA, E. S. Different silicon forms signalize an input of urbanized river and indicate the presence of phytoplankton with silicon structures in the

tropical coastal area of Recife (PE-Brazil). Brazilian Journal of Oceanography, v. 66, n. 1, p. 104–114, 2018.

BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. Journal of Statistical Software, v. 67, n. 1, p. 1–48, 2015. DOI: 10.18637/jss.v067.i01.

BENITEZ-NELSON, C. R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. Earth-Science Reviews, v. 51, n. 1–4, p. 109–135, 2000. DOI: 10.1016/S0012-8252(00)00018-0.

BELL, P. R. F. Eutrophication and coral reefs—some examples in the Great Barrier Reef lagoon. Water Research, v. 26, n. 5, p. 553–568, 1992. DOI: 10.1016/0043-1354(92)90228-V.

BELL, P. R. F.; ELMETRI, I.; LAPOINTE, B. E. Evidence of large-scale chronic eutrophication in the Great Barrier Reef: quantification of chlorophyll a thresholds for sustaining coral reef communities. Ambio, v. 43, n. 3, p. 361–376, 2014. DOI: 10.1007/s13280-013-0443-1.

BOYER, E. W. et al. Anthropogenic nitrogen sources and relationships to riverine nitrogen export in the northeastern U.S.A. Biogeochemistry, v. 57, p. 137–169, 2002.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Brasília, DF: CONAMA, 2005.

COSTA, O. S. et al. Nutrification impacts on coral reefs from northern Bahia, Brazil. Hydrobiologia, v. 440, p. 307–315, 2000. DOI: 10.1023/A:1004104118208.

COSTA JR., O. S. et al. Anthropogenic nutrient pollution of coral reefs in Southern Bahia, Brazil. Brazilian Journal of Oceanography, v. 55, n. 4, p. 257–265, 2007. DOI: 10.1590/S1679-87592007000400004.

DÍAZ-ORTEGA, G.; HERNÁNDEZ-DELGADO, E. A. Unsustainable land-based source pollution in a climate of change: a roadblock to the conservation and recovery of Elkhorn coral Acropora palmata (Lamarck 1816). Natural Resources, v. 5, p. 561–581, 2014.

DINIZ, M. T. M.; PEREIRA, V. H. C. Climatologia do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil: sistemas atmosféricos atuantes e mapeamento de tipos de clima. Boletim Goiano de Geografia, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 488–506, 2015.

EZZAT, L.; MAGUER, J.-F.; GROVER, R.; FERRIER-PAGÈS, C. New insights into carbon acquisition and exchanges within the coral–dinoflagellate symbiosis under NH_4^+ and NO_3^- supply. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 282, n. 1812, 20150610, 2015. DOI: 10.1098/rspb.2015.0610.

FERRIER-PAGÈS, C. et al. Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral Stylophora pistillata. Coral Reefs, v. 19, p. 103–113, 2000.

FROELICH, P. N. Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: a primer on the phosphate buffer mechanism. Limnology and Oceanography, v. 33, n. 4, p. 649–668, 1988. DOI: 10.4319/lo.1988.33.4part2.0649.

GEIDER, R. J.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. European Journal of Phycology, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2002. DOI: 10.1017/S0967026201003456.

GUIMARÃES, G. P.; MELLO, W. Z. Estimativa do fluxo de amônia na interface ar-mar na Baía de Guanabara: estudo preliminar. Química Nova, v. 29, n. 1, p. 54–60, 2006.

GUO, J. et al. Potential impacts of anthropogenic nutrient enrichment on coral reefs in the South China Sea: evidence from nutrient and chlorophyll a levels in seawater. Environmental Science: Processes & Impacts, v. 21, p. 1745–1753, 2019. DOI: 10.1039/C9EM00331B.

HASSAN, R. M.; SCHOLES, R.; ASH, N. (eds.). Ecosystems and human well-being: current state and trends: findings of the Condition and Trends Working Group of the Millennium Ecosystem Assessment. Washington, DC: Island Press, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Demográfico 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

LARNED, S. T. Nitrogen- versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae. Marine Biology, v. 132, p. 409–421, 1998.

LARKUM, A. W. D.; STEVENS, G. ENCORE: the effect of nutrient enrichment on coral reefs. 1. Experimental design and research programme. Marine Pollution Bulletin, v. 29, n. 1–3, p. 112–120, 1994.

LENTH, R. emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.8.5, 2023. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/package=emmeans. Acesso em: 31 ago. 2026.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. Limnology and Oceanography, v. 12, n. 2, p. 343–346, 1967. DOI: 10.4319/lo.1967.12.2.0343.

MAGUIRE, T. J.; FULWEILER, R. W. Urban dissolved silica: quantifying the role of groundwater and runoff in wastewater influent. Environmental Science & Technology, v. 50, n. 1, p. 54–61, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.5b03516.

MCKINNEY, M. L. Is marine biodiversity at less risk? Evidence and implications. Diversity and Distributions, v. 4, n. 1, p. 3–8, 1998.

MEYER, J. L.; SCHULTZ, E. T.; HELFMAN, G. S. Fish schools: an asset to corals. Science, v. 220, n. 4601, p. 1047–1049, 1983. DOI: 10.1126/science.220.4601.1047.

PRINCIPE, P. P. et al. Quantifying coral reef ecosystem services. Research Triangle Park: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, 2012. EPA/600/R-11/206.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023.

REDFIELD, A. C. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In: JAMES JOHNSTONE MEMORIAL VOLUME. Liverpool: University Press, 1934. p. 176–192.

REDFIELD, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. American Scientist, v. 46, p. 205–221, 1958.

REDFIELD, A. C.; KETCHUM, B. H.; RICHARDS, F. A. The influence of organisms on the composition of seawater. In: HILL, M. N. (ed.). The Sea: ideas and observations on progress in the study of the seas. New York: Interscience, 1963. v. 2, p. 26–77.

SARMIENTO, J. L.; GRUBER, N. Ocean biogeochemical dynamics. Princeton: Princeton University Press, 2006. 528 p.

SILVEIRA, A. B. S. Análise da bacia hidrográfica do Rio Punaú–Rio Grande do Norte utilizando ferramentas de geoprocessamento. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

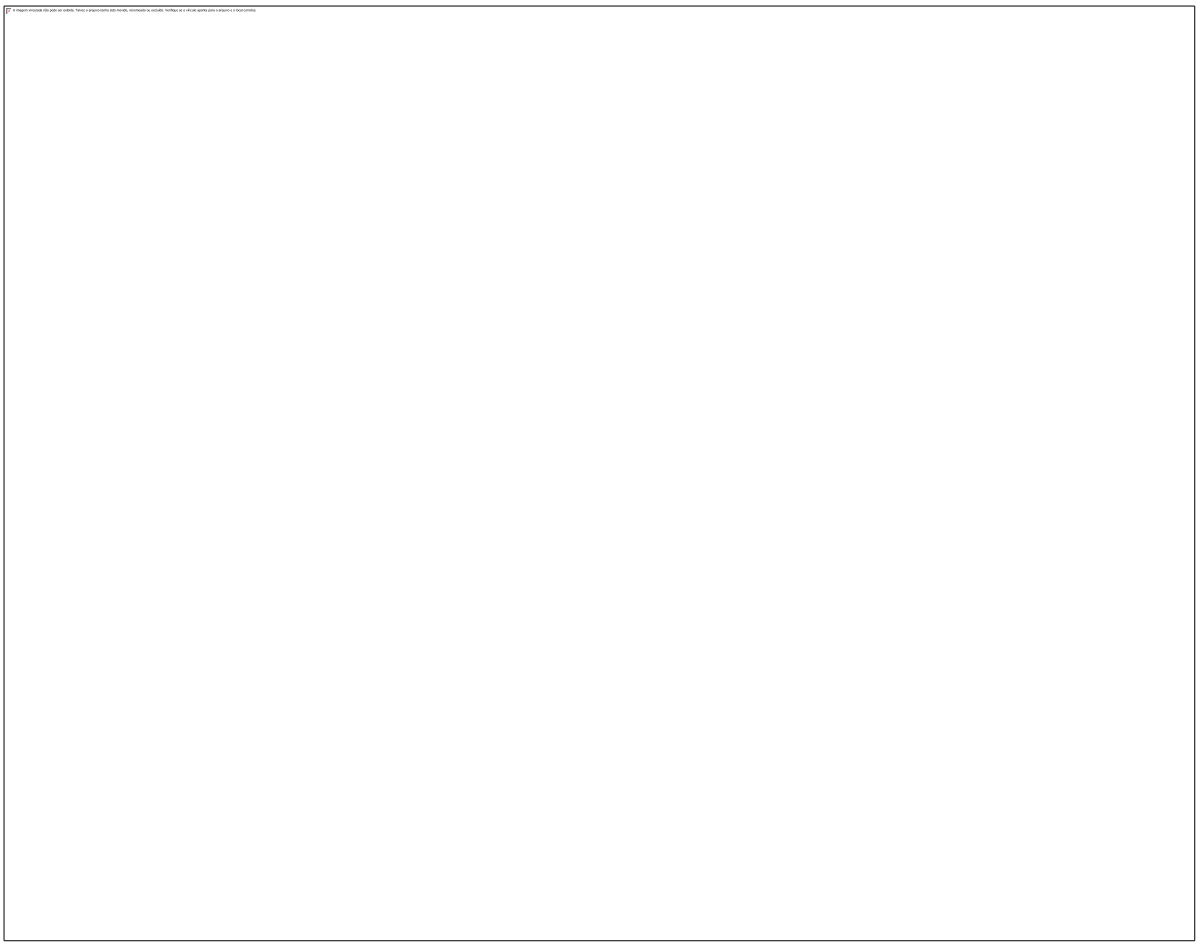
SMITH, V. H. Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment. Limnology and Oceanography, v. 51, n. 1, p. 377–384, 2006. DOI: 10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0377.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). 2012 guidelines for water reuse. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2012. EPA/600/R-12/618.

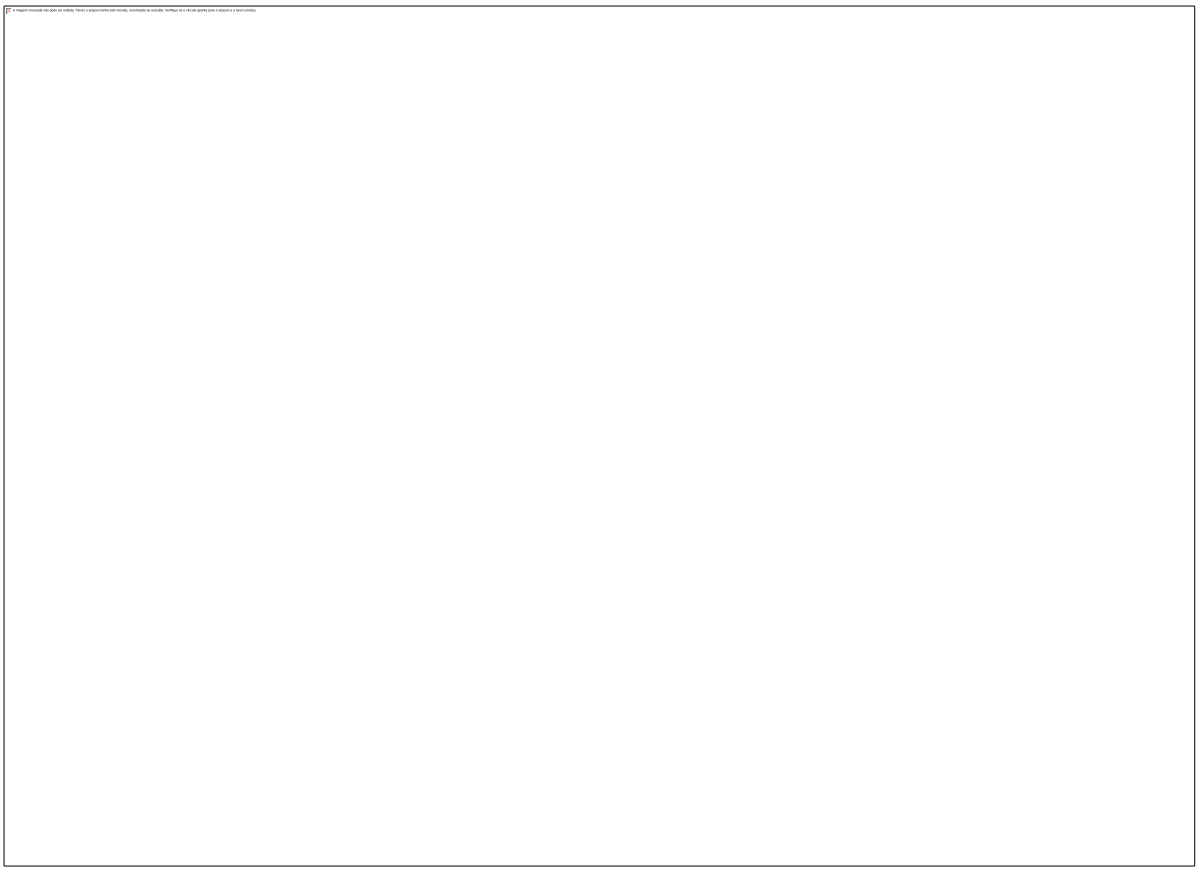
WARD, B. B. Nitrification in marine systems. In: CAPONE, D. G.; BRONK, D. A.; MULHOLLAND, M. R.; CARPENTER, E. J. (eds.). Nitrogen in the marine environment. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 199–261. DOI: 10.1016/B978-0-12-372522-6.00005-0.

WOLF-GLADROW, D. A.; KLAAS, C. Total alkalinity change: the perspective of phytoplankton stoichiometry. Limnology and Oceanography, v. 69, p. 1900–1904, 2024. DOI: 10.1002/lno.12597.

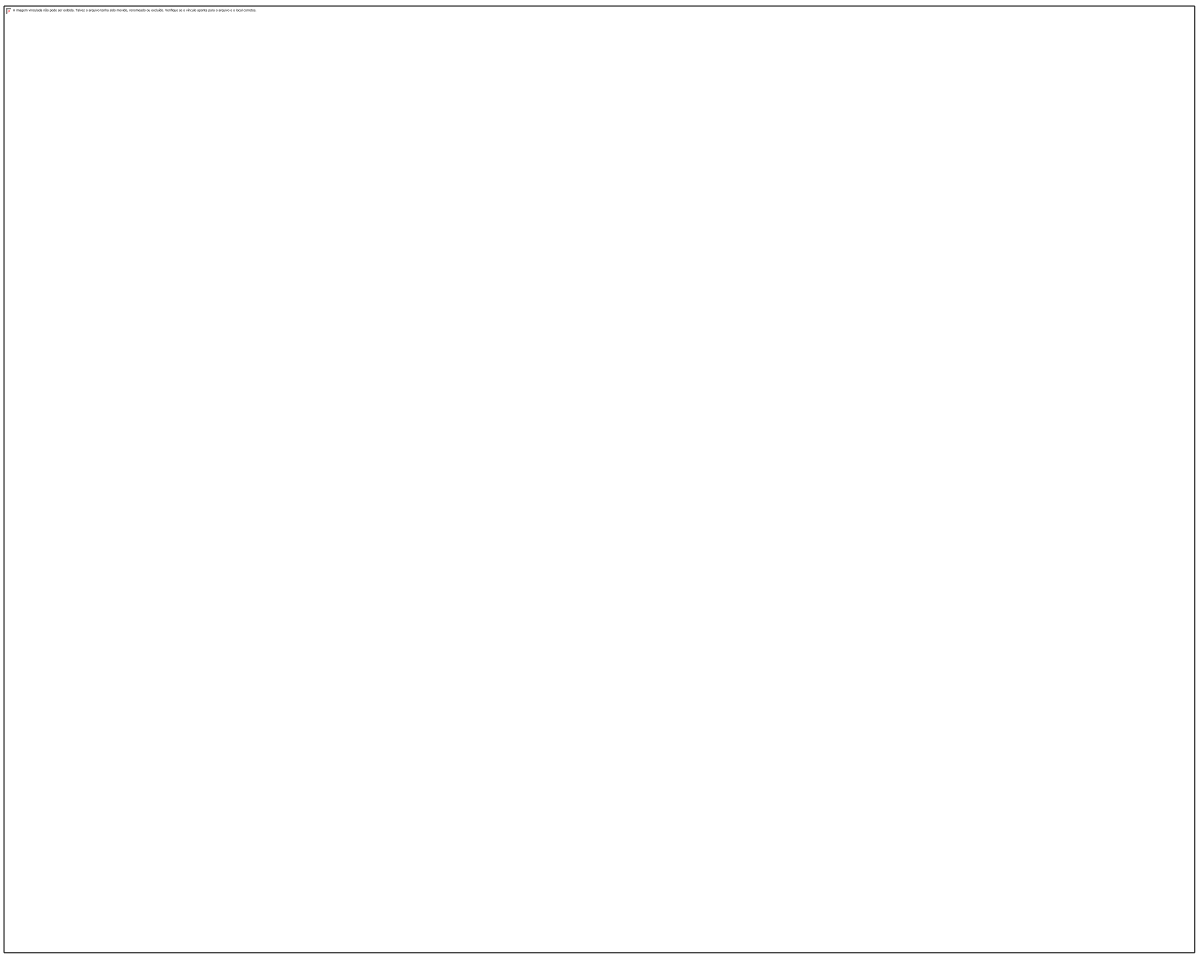
Anexos



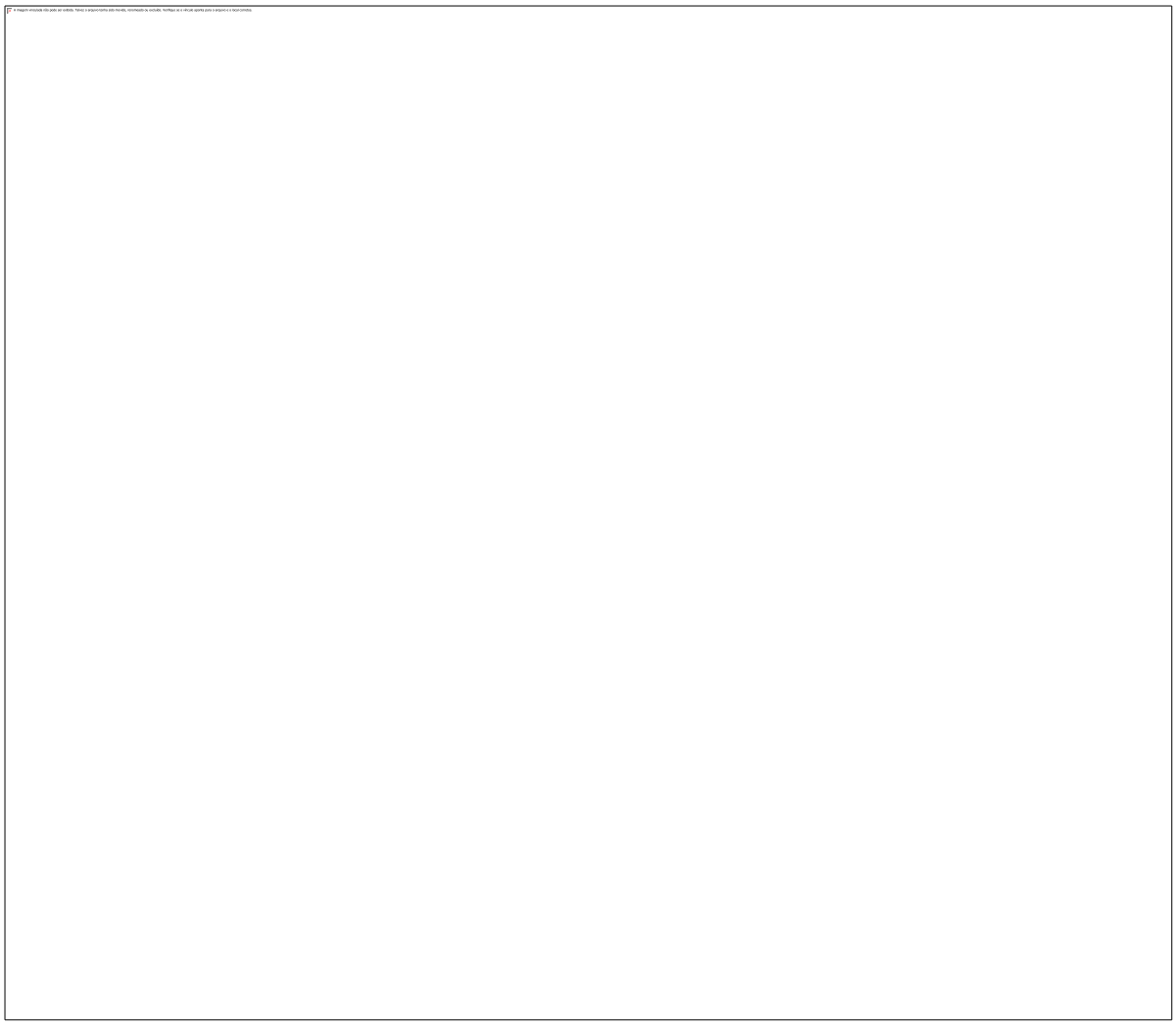
Mapa de localização do município de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte



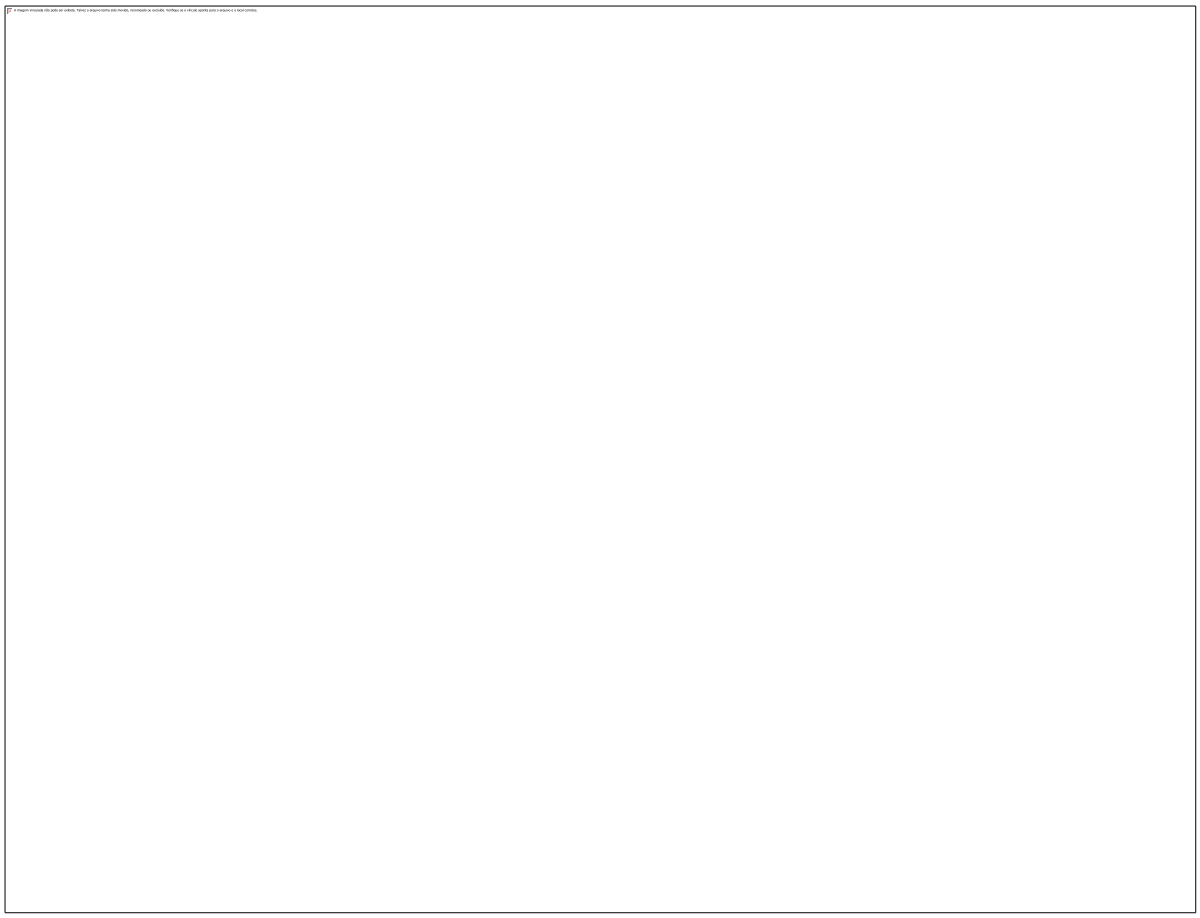
Localização dos pontos de coleta no Córrego de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte



Localização dos pontos de coleta nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte



Variação espaço-temporal das concentrações de nitrogênio amoniacal no Córrego e nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



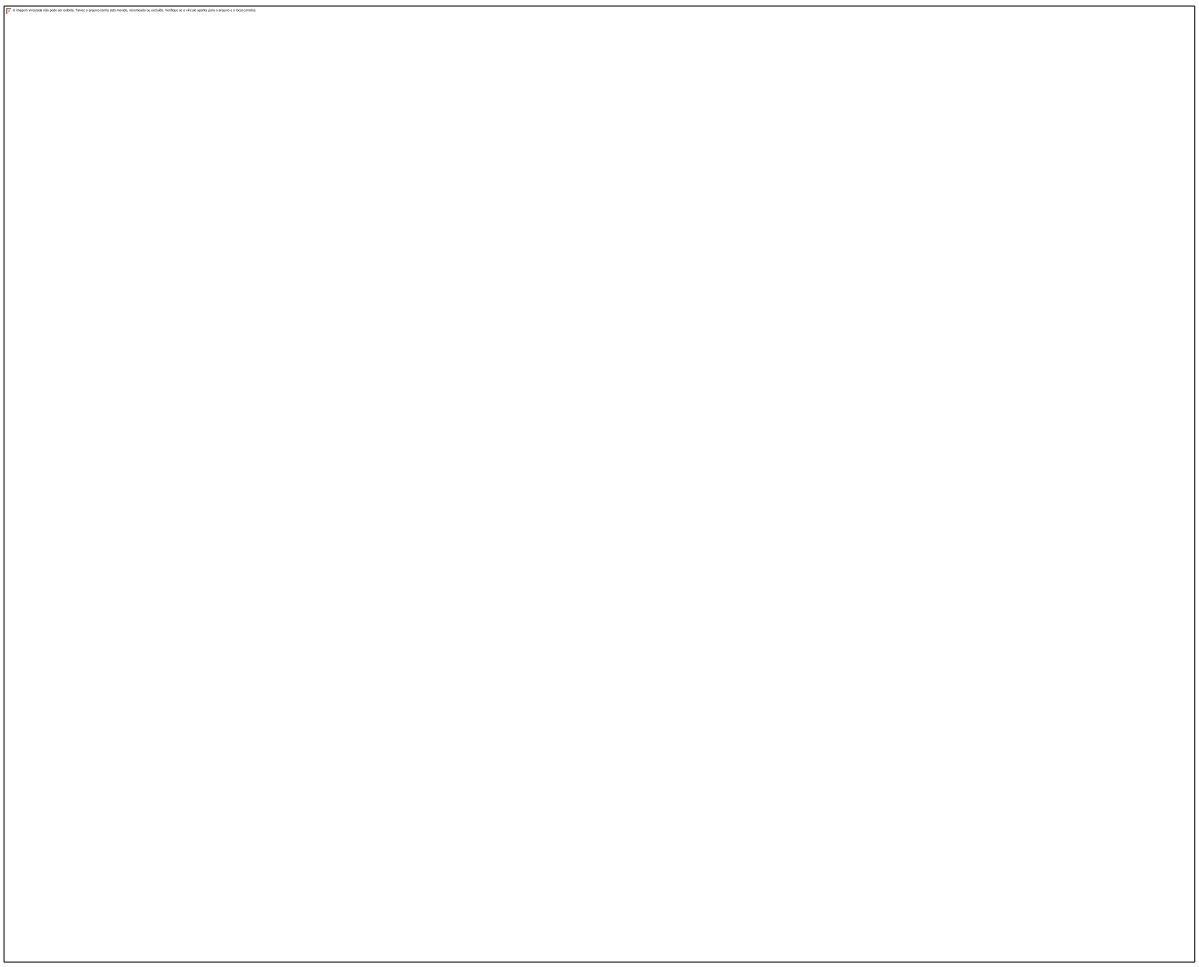
Variação espaço-temporal das concentrações de silicato no Córrego e nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



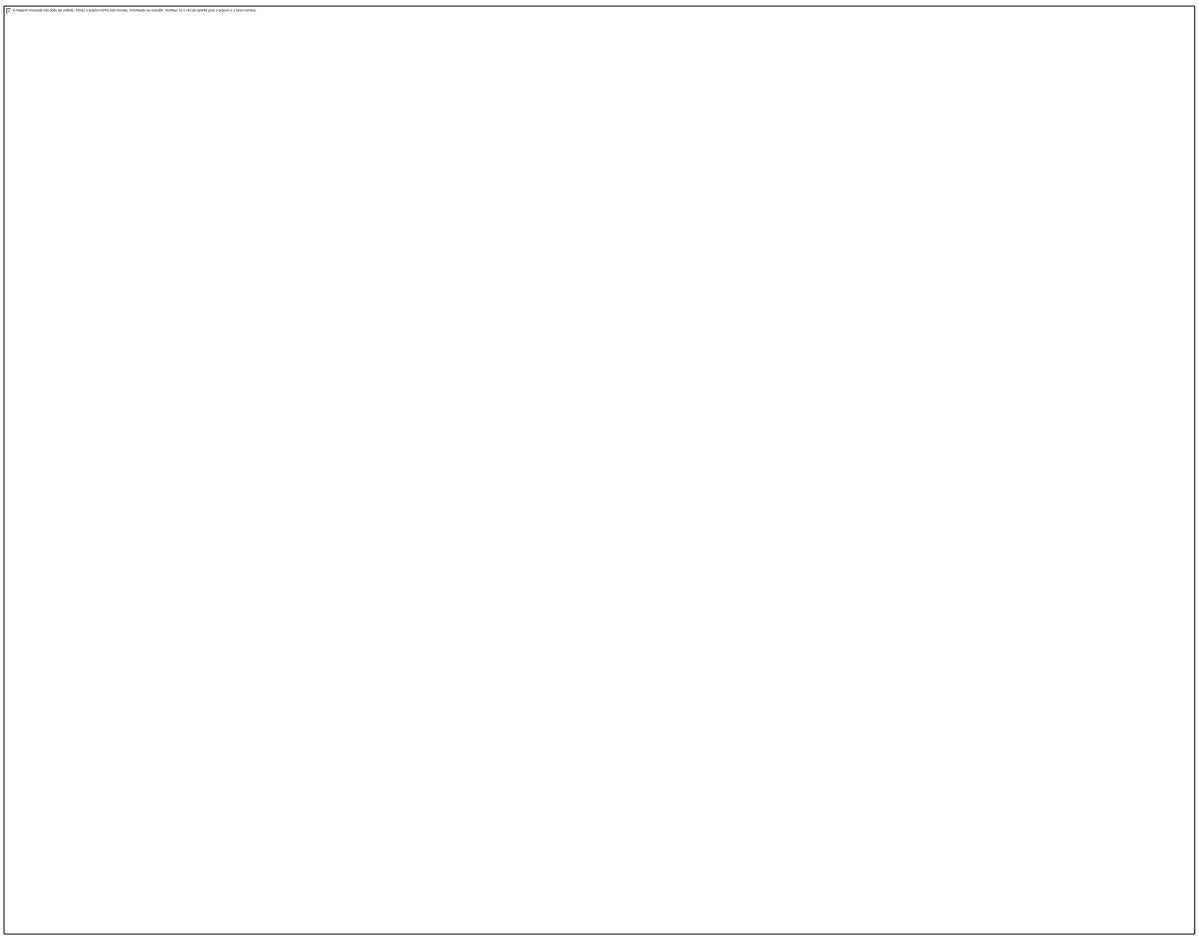
Variação espaço-temporal das concentrações de clorofila-a no Córrego e nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



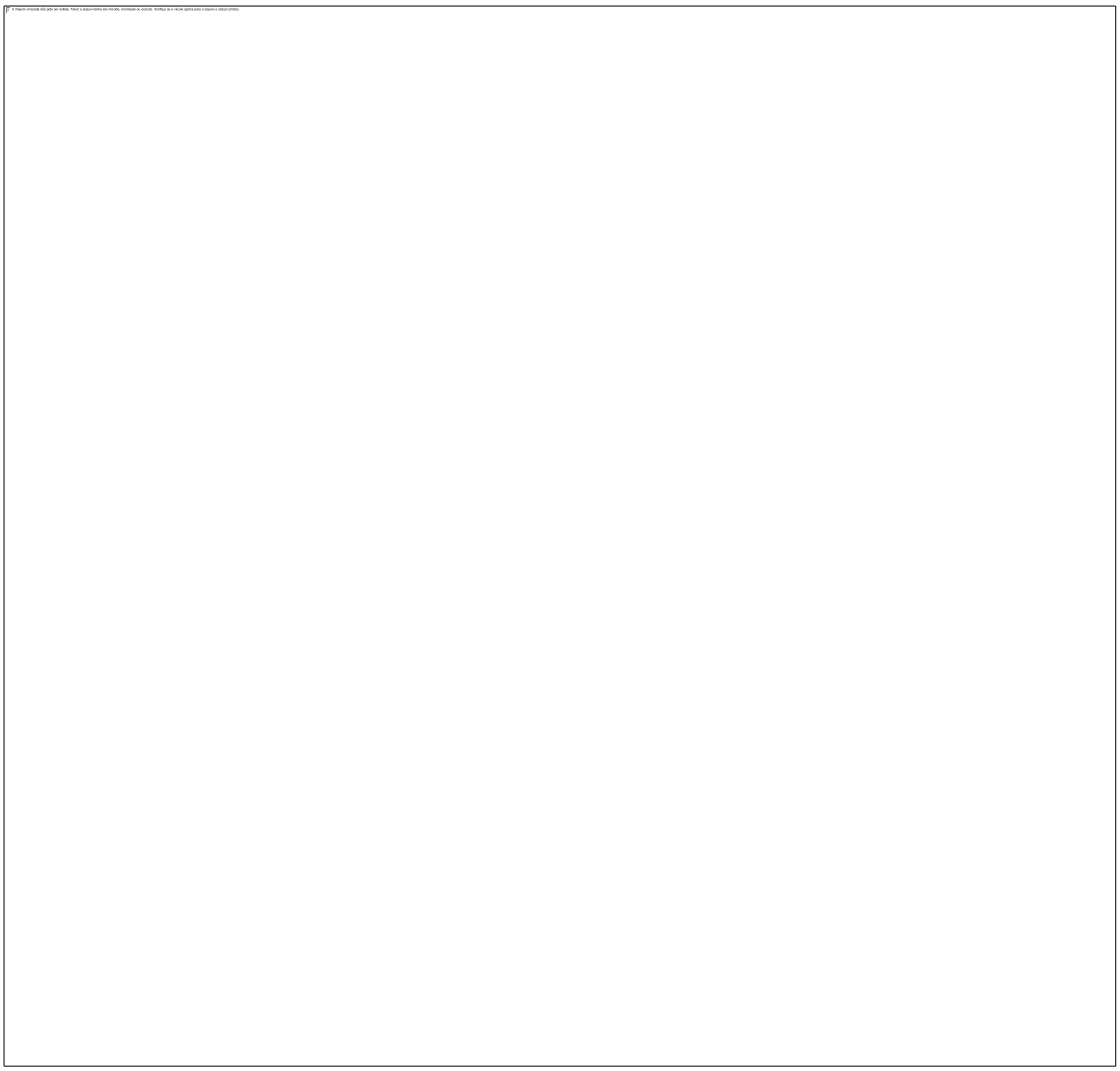
Variação espaço-temporal das concentrações de nitrito no Córrego e nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



Variação espaço-temporal das concentrações de nitrato no Córrego e nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



Variação espaço-temporal das concentrações de ortofosfato no Córrego e nos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



Matriz de correlação entre as variáveis físico-químicas e as concentrações de nutrientes nos ambientes estudados em Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.



Razão de Redfield (DIN:DIP) nos ambientes do Córrego e dos Parrachos de Rio do Fogo, Rio Grande do Norte.

CÓDIGO: ET1449

AUTOR: JOAQUIM GABRIEL DE OLIVEIRA ALVES

ORIENTADOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

TÍTULO: Interações entre a acidificação oceânica e a poluição plástica para a calcificação e saúde do coral Siderastrea sp.

Resumo

A acidificação oceânica (AO) e a poluição plástica (PP) estão entre as principais ameaças aos recifes de coral, mas seus efeitos combinados ainda são pouco compreendidos. Nesse contexto, este estudo investigou, de forma inédita, os impactos individuais e combinados da AO e da PP sobre o coral Siderastrea sp., gênero comum na costa brasileira. Para isso, colônias foram expostas por três semanas a quatro tratamentos: Controle, Acidificado, Plástico e Acidificado + Plástico. O tratamento combinado reduziu a saturação de aragonita a 0,95, condição subsaturada que favorece dissolução esquelética, e causou queda precoce na calcificação. Apesar do aumento transitório da produtividade primária e da estabilidade fotossintética, o tratamento acidificado elevou em 66% a área de coloração clara, sinal de branqueamento inicial. Não houve sinergismo estatístico, mas ambos os estressores afetaram negativamente a calcificação, possivelmente com interação mediada pela liberação de aditivos plásticos sob acidificação. Conclui-se que AO e PP são riscos independentes e potencialmente interativos para os recifes brasileiros, demandando conservação integrada.

Palavras-chave: pH. Microplástico. Aragonita. Sistema carbonato. Interação sinérgica

TITLE: Interactions between ocean acidification and plastic pollution on the calcification and health of the coral Siderastrea sp.

Abstract

Ocean acidification (OA) and plastic pollution (PP) are among the main threats to coral reefs, yet their combined effects remain poorly understood. In this context, this study investigated, for the first time, the individual and combined impacts of OA and PP on the coral Siderastrea sp., a common genus on the Brazilian coast. Colonies were exposed for three weeks to four treatments: Control, Acidified, Plastic, and Acidified + Plastic. The combined treatment reduced aragonite saturation to 0.95, a subsaturated condition that favors skeletal dissolution, and caused an early decline in calcification. Despite a transient increase in primary productivity and photosynthetic stability, the acidified treatment increased the area of light coloration by 66%, a sign of early

bleaching. No statistical synergism was observed, but both stressors negatively affected calcification, possibly with interaction mediated by the release of plastic additives under acidification. It is concluded that OA and PP are independent and potentially interactive risks to Brazilian reefs, demanding integrated conservation efforts.

Keywords: pH. Microplastic. Aragonite. Carbonate system. Synergistic interaction

Introdução

Os recifes de coral estão entre os ecossistemas mais biodiversos e valiosos do planeta, ocupando predominantemente a faixa intertropical (30°S a 30°N) em águas quentes, alcalinas e oligotróficas (Hoegh-Guldberg et al., 2017). Sua formação decorre da deposição contínua de carbonato de cálcio por corais escleractínios, processo sustentado pela endossimbiose com zooxantelas, que fornecem compostos orgânicos ao hospedeiro em troca de proteção e nutrientes (Zilberberg et al., 2016). Graças a essa associação, os recifes abrigam cerca de 30% das espécies marinhas conhecidas em menos de 1% do assoalho oceânico (Porter; Tougas, 2001; Spalding; Ravilious; Green, 2001), sustentando a pesca, a proteção costeira e o fornecimento de fármacos, com valor econômico anual superior a US$ 375 bilhões (Hoegh-Guldberg et al., 2017).

Apesar de sua importância, esses ecossistemas enfrentam ameaças globais, entre as quais se destaca a acidificação oceânica (AO). Esse processo é impulsionado pelo aumento das emissões antropogênicas de CO_2, cujas concentrações atmosféricas são hoje 52% superiores às do período pré-industrial (Friedlingstein et al., 2025). Cerca de um terço desse carbono é absorvido pelos oceanos (Gruber et al., 2019), onde reage com a água do mar, reduzindo o pH e a disponibilidade de íons carbonato, essenciais à calcificação (Feely et al., 2001; Doney et al., 2009). Projeta-se que a saturação de $CaCO_3$ diminua entre 25% e 50% até 2100, comprometendo a densidade esquelética dos corais e sua resistência à bioerosão (Kleypas, 2006; Cornwall et al., 2021).

Além da AO, outro estressor de escala global ameaça os recifes: a poluição plástica (PP). Esta tornou-se uma das pressões mais disseminadas nos oceanos, afetando os recifes pela retenção física de detritos (Lartaud et al., 2020) e pelos efeitos da ingestão de microplásticos (MPs < 5 mm), que desencadeiam estresse oxidativo, redução do crescimento e prejuízos à simbiose coral-zooxantela (Chapron et al., 2018; Lanctôt et al., 2020; Rocha et al., 2020). Além disso, a fragmentação dos plásticos por fotodegradação libera carbono orgânico dissolvido e CO_2 (Gewert et al., 2015; Romera-Castillo et al., 2022), estimulando a respiração microbiana e reduzindo o pH localmente (Romera-Castillo et al., 2018; Galgani; Loiselle, 2021), o que pode intensificar a acidificação em regiões costeiras (Cai et al., 2011). Assim, os microplásticos podem atuar como uma via química que retroalimenta a AO (Romera-Castillo et al., 2023), sugerindo que seus efeitos ultrapassam a dimensão física e influenciam a biogeoquímica recifal.

Siderastrea é um gênero de coral massivo amplamente distribuído na costa brasileira, reconhecido por sua resistência a variações ambientais (Castro; Pires, 2001; Leão; Kikuchi; Testa, 2003). Sua robustez, associada à facilidade de manutenção em cativeiro, o torna um modelo adequado para estudos de estresse fisiológico em laboratório (Lins de Barros et al., 2013; Mies et al., 2020).

Apesar do crescente número de investigações sobre os impactos isolados desses dois estressores (Kleypas, 2006; Cornwall et al., 2021; Chapron et al., 2018; Lanctôt et al., 2020), seus efeitos interativos sobre a calcificação coralínea ainda são pouco

compreendidos, e a escassez de estudos experimentais que avaliem essa combinação representa uma lacuna crítica para a conservação dos recifes. As questões aqui propostas são inéditas e visam direcionar futuras estratégias de manejo que considerem múltiplos fatores de impacto atuando de forma combinada, contribuindo para o avanço do conhecimento em oceanografia química e para a conservação desses ecossistemas ameaçados. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal compreender os efeitos individuais e combinados da PP e da AO sobre o metabolismo e saúde do coral escleractíneo Siderastrea sp. A hipótese central é que a combinação de AO e PP produz efeito sinérgico negativo, reduzindo a calcificação em magnitude superior à soma dos efeitos isolados.

Metodologia

1) Delineamento experimental e sistema de manutenção

Para compreender os efeitos individuais e sinérgicos AO e da PP sobre a calcificação e a saúde de Siderastrea sp., 16 colônias foram coletadas nos recifes de Rio do Fogo (RN), transportadas ao Laboratório de Experimentação Aquática da UFRN e aclimatadas em água do mar natural por 5 dias a 27 ºC. Após esse período, as colônias foram distribuídas em quatro sistemas experimentais independentes, cada um com cinco aquários de 2 L (quatro com colônias e um branco, sem colônias), totalizando 20 unidades experimentais. Cada sistema possuía volume total de 20 L, com reservatório inferior acoplado contendo uma bomba para circulação da água.

Os quatro sistemas representaram os seguintes tratamentos, mantidos durante três semanas: (I) controle; (II) acidificado; (III) plástico; (IV) acidificado + plástico (Figura 1). O plástico consistiu em detritos naturalmente envelhecidos, coletados na Praia da Redinha, Natal (RN), e retidos em peneiras de malha entre 2 mm e 4 mm. O pH dos tratamentos acidificados baseou-se nas projeções do IPCC (2021) para o cenário SSP3-7.0 e foi controlado pelo borbulhamento de CO_2 via sistema APEX Fusion© (Neptune Systems), cujo pHmetro integrado interrompe ou aciona o fluxo de gás conforme o valor aferido. O aquário branco em cada sistema permitiu descontar, nos cálculos, as variações na química da água decorrentes da atividade metabólica das comunidades planctônicas.

A iluminação dos aquários foi fornecida por uma luminária LED Maxspect RSX 150 (160 W), programada para simular o fotoperíodo e a intensidade de luz desejados. As especificações da luminária e a intensidade de emissão luminosa nos diferentes comprimentos de onda ao longo do ciclo diário estão apresentadas na Tabela 1.

2) Análises físico-químicas, calcificação e produtividade primária

Ao final de cada semana experimental (T1, T2 e T3), realizaram-se incubações de 2 horas, seguidas de amostragens no tempo inicial e final das incubações para medição das variáveis: pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e salinidade, além de coletas para alcalinidade total (AT) e nutrientes inorgânicos dissolvidos. A AT foi determinada por titulação potenciométrica com HCl 0,1 M (método SOP03b), utilizando titulador automático ECO Titrator Metrohm® (Dickson et al., 2007), com controle analítico baseado em material certificado de referência (Dr. A. Dickson, Scripps Institution of Oceanography). Para as análises de nutrientes, as amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro (0,45 µm) e a alíquota congelada até a análise. A quantificação dos nutrientes inorgânicos dissolvidos (ortofosfato, nitrito, nitrato, N-amoniacal e silicato) seguiu os protocolos de Grasshoff, et al. (1999), empregando técnicas de colorimetria e espectrofotometria. O nitrato foi previamente convertido a

nitrito por passagem em coluna redutora de cádmio. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV/VIS, utilizando os seguintes comprimentos de onda: 810 nm para ortofosfato e silicato, 543 nm para nitrito e nitrato, e 630 nm para N-amoniacal.

A especiação do sistema carbonato foi calculada por modelo de associações iônicas a partir da AT, pH, salinidade, temperatura e nutrientes (Carmouze, 1994; Zeebe; Wolf-Gladrow, 2001), com o programa CO2SYS.exe (Lewis; Wallace, 1998), empregando as constantes K1 e K2 de Mehrbach et al. (1973) replotadas por Dickson e Millero (1987), KH de Dickson (1990) e pH na escala Total. Obtiveram-se: pCO_2, concentrações de HCO_3^-, CO_3^{2-}, CO_2 dissolvido, carbono inorgânico dissolvido total (CID) e estado de saturação da aragonita (Ωarag). As taxas de calcificação/dissolução de $CaCO_3$ basearam-se no método da anomalia da alcalinidade (Smith; Kinsey, 1978), que assume que a precipitação de 1 mol de $CaCO_3$ reduz a AT em 2 mols. A taxa bruta (G) foi calculada pela relação $G = -0{,}5 \times \rho w \times (\Delta AT/\Delta t)$, sendo ρw a densidade da água do mar e $\Delta AT/\Delta t$ a taxa de alteração da AT no período de tempo de incubação. Os valores foram normalizados pela área superficial de cada colônia, conforme Schneider e Erez (2006). A Produção Primária Líquida (PPL) foi calculada pela variação de O_2 durante as mesmas incubações, conforme a equação $PPL = [\Delta O_2 \times (Vc - Va)]/(t \times A)$, sendo ΔO_2 a variação na concentração de O_2, Vc o volume da câmara de incubação, Va o volume ocupado pela colônia, t o tempo de incubação e A a área da colônia. Os valores obtidos foram normalizados pela área das colônias (Schneider; Erez, 2006).

3) Avaliação da saúde das colônias

Indicadores de saúde das colônias (eficiência fotossintética e nível de branqueamento) também foram monitorados semanalmente. A eficiência fotossintética dos simbiontes foi aferida com um fluorômetro de modulação de amplitude de pulso (PAM), registrando a eficiência efetiva adaptada à luz (ΔF/Fm') (Schreiber; Schliwa; Bilger, 1986), em que ΔF representa a variação da fluorescência e Fm', a fluorescência máxima adaptada à luz (Van Kooten; Snel, 1990). Para avaliar a coloração, cada colônia foi fotografada ao lado de uma ficha de saúde Coral Watch (Siebeck et al., 2006), cuja escala de cores varia de D1 a D6, na qual as categorias mais baixas indicam branqueamento e as mais altas refletem uma coloração mais intensa dos tecidos, utilizada como indicativo de boa saúde da colônia. A quantificação da área de cobertura do coral por escala de cor foi executada por meio do software ImageJ.

4) Análises estatísticas

As variações observadas para AT, eficiência fotossintética (ΔF/Fm'), coloração (escala Coral Watch), taxas de calcificação e de PPL, foram analisadas por meio de modelos lineares mistos. Em cada modelo, consideraram-se como efeitos fixos o tratamento, o tempo de amostragem (T1, T2 e T3) e a interação entre esses fatores; enquanto a colônia foi incluída como efeito aleatório. Todas as análises foram executadas no software R versão 4.4.1 (R Core Team, 2024), adotando-se o nível de significância de $p < 0{,}05$.

Resultados e Discussões

1) Variáveis físico-químicas, calcificação e produtividade primária líquida (PPL)

Os parâmetros físico-químicos monitorados ao longo do experimento confirmaram a eficácia do sistema de controle das condições experimentais (Tabela 2). A temperatura

manteve-se estável em todos os tratamentos, com médias variando entre 27,05 °C (Controle) e 28,03 °C (Acidificado), e a salinidade oscilou dentro de uma faixa estreita (36,37 a 37,97), sem diferenças expressivas entre os grupos. Os níveis de oxigênio dissolvido permaneceram acima de 5,7 mg/L em todos os tratamentos, evidenciando a manutenção de condições oxigenadas ao longo do experimento. O pH variou de acordo com as condições experimentais estabelecidas, com médias de 7,99 e 8,01 para os tratamentos Controle e Plástico, respectivamente, enquanto os tratamentos acidificados (Acidificado e Acidificado + Plástico) atingiram valores de 7,65 e 7,55, em conformidade com as projeções do IPCC (2021) para o cenário SSP3-7.0. Esses resultados demonstram que o sistema APEX Fusion© manteve o pH dentro das faixas-alvo.

A caracterização do sistema carbonato revelou alterações variações entre os tratamentos considerados, característicos do processo de acidificação (Tabela 3). As concentrações de CO_2 dissolvido aumentaram consideravelmente nos tratamentos acidificados, passando de 24,08 µmol/L (Controle) e 22,85 µmol/L (Plástico) para 55,34 µmol/L (Acidificado) e 73,13 µmol/L (Acidificado + Plástico). Este incremento reflete o borbulhamento de CO_2 e está na base das mudanças subsequentes na especiação do carbono inorgânico. As concentrações de íons bicarbonato (HCO_3^-) elevaram-se de aproximadamente 2.011–2.043 µmol/L nos tratamentos não acidificados para 2.262–2.290 µmol/L nos acidificados, enquanto as concentrações de íons carbonato (CO_3^{2-}), essenciais para a biomineralização do esqueleto coralíneo, sofreram redução drástica: de 138–153 µmol/L para 59–79 µmol/L. Como consequência direta, o Ωarag caiu de 2,19 (Controle) e 2,41 (Plástico) para 1,25 (Acidificado) e 0,95 (Acidificado + Plástico). Este último valor é particularmente preocupante, pois Ωarag abaixo de 1 indica que a água do mar se encontrava subsaturada em relação à aragonita, condição na qual o $CaCO_3$ tende termodinamicamente à dissolução, e não à precipitação (Zeebe; Wolf-Gladrow, 2001), contribuindo para a descalcificação dos corais.

A alcalinidade total (AT) apresentou padrões distintos de variação ao longo das incubações em cada tratamento. No Controle, a AT reduziu continuamente, passando de 2.438 µmol/kg na incubação 1 para 2.348 µmol/kg na incubação 2 e 2.284 µmol/kg na incubação 3, com diferenças significativas entre todas as incubações (T1 vs. T2: $t = 16{,}713$; $p < 0{,}0001$; T1 vs. T3: $t = 28{,}638$; $p < 0{,}0001$; T2 vs. T3: $t = 11{,}924$; $p < 0{,}0001$), indicando consumo constante de carbonato pela calcificação. No tratamento Acidificado, a AT permaneceu estável, com médias de 2.457 µmol/kg (T1), 2.456 µmol/kg (T2) e 2.462 µmol/kg (T3), sem diferenças significativas entre as incubações ($p > 0{,}05$). No tratamento Plástico, a AT variou de 2.438 µmol/kg (T1) para 2.399 µmol/kg (T2) e 2.436 µmol/kg (T3), com queda significativa da incubação 1 para a 2 ($t = 7{,}261$; $p < 0{,}0001$) e recuperação da 2 para a 3 ($t = -6{,}873$; $p < 0{,}0001$), retornando ao patamar inicial. Já no tratamento Acidificado + Plástico, a AT manteve-se entre 2.455 µmol/kg (T1) e 2.457 µmol/kg (T2), sem diferença entre essas incubações, e reduziu para 2.404 µmol/kg na incubação 3, que foi significativamente menor do que as anteriores (T1 vs. T3: $t = 9{,}646$; $p < 0{,}0001$; T2 vs. T3: $t = 9{,}922$; $p < 0{,}0001$), evidenciando que a redução da alcalinidade só se manifestou na fase final do experimento.

Nas comparações entre tratamentos, a incubação 1 não revelou diferenças significativas, indicando que todos os grupos partiram de condições semelhantes. Na incubação 2, o Controle apresentou AT significativamente menor do que o Acidificado ($t = -15{,}651$; $p < 0{,}0001$), o Plástico ($t = -7{,}375$; $p < 0{,}0001$) e o Acidificado + Plástico ($t = -15{,}733$; $p < 0{,}0001$). O Acidificado, por sua vez, exibiu valores maiores do que o Plástico ($t = 8{,}276$; $p < 0{,}0001$), mas não diferiu do Acidificado + Plástico. Na incubação 3, o

Controle permaneceu com AT menor do que todos os demais tratamentos (Controle vs. Acidificado: $t = -25,688$; $p < 0,0001$; Controle vs. Plástico: $t = -21,926$; $p < 0,0001$; Controle vs. Acidificado + Plástico: $t = -17,283$; $p < 0,0001$). O Acidificado foi significativamente maior do que o Plástico ($t = 3,762$; $p = 0,0043$) e do que o Acidificado + Plástico ($t = 8,405$; $p < 0,0001$), e o Plástico apresentou AT maior do que o Acidificado + Plástico ($t = 4,643$; $p = 0,0004$).

Considerando o princípio da anomalia da alcalinidade, que estabelece que a precipitação de 1 mol de $CaCO_3$ reduz a AT em 2 mols (Smith; Kinsey, 1978), o padrão observado indica que os corais do tratamento Controle continuaram calcificando ativamente. Nos demais tratamentos, a ausência desse padrão consistente de redução, e, em alguns casos, a manutenção de valores elevados de AT, sugere comprometimento da calcificação, ainda que de forma variável conforme o estressor aplicado.. Estes resultados são coerentes com estudos anteriores que demonstram reduções nas taxas de calcificação de diferentes espécies de corais escleractíneos expostos a condições semelhantes de acidificação (Carbonne et al., 2022; Grillo et al., 2025; Tambutté et al., 2015). No entanto, os dados aqui apresentados evidenciam, de forma inédita, que a poluição plástica também compromete esse processo fisiológico fundamental, seja isoladamente, seja em combinação com a AO.

As taxas de calcificação medidas ao longo das incubações reforçam essas observações (Tabela 4; Figura 2). Embora os testes estatísticos não tenham mostrado diferenças nas taxas de calcificação entre os tratamentos e o tempo das incubações (Tabela 5A), houve uma clara tendência de variações nesse processo de acordo com as condições avaliadas. O tratamento Controle manteve níveis de calcificação estáveis em todas as incubações, com valores médios de 0,51 ± 0,21 µmol CaCO3 cm-2 h-1, enquanto as menores taxas foram registradas no tratamento sinérgico (Acidificado + Plástico; média de 0,33 ± 0,21 µmol CaCO3 cm-2 h-1), seguido do Plástico (0,34 ± 0,44 µmol CaCO3 cm-2 h-1) e do tratamento Acidificado (0,38 ± 0,42 µmol CaCO3 cm-2 h-1). Adicionalmente, algumas colônias submetidas aos tratamentos Acidificado e Plástico apresentaram taxas negativas, indicando dissolução líquida do esqueleto carbonático destes corais.

A dissolução do esqueleto carbonático em resposta à acidificação oceânica já é um fenômeno amplamente documentado na literatura. Estudos demonstram que, em condições de subsaturação da aragonita, os esqueletos dos corais tornam-se vulneráveis à dissolução e à bioerosão acelerada, processos que podem comprometer a integridade estrutural dos recifes e levar ao seu colapso em cenários futuros (Andersson; Gledhill, 2013; Davis et al., 2021). Nesse contexto, os dados aqui apresentados são particularmente relevantes ao evidenciarem, de forma inédita, que a poluição plástica também pode induzir dissolução líquida do esqueleto carbonático. Esse resultado sugere que o plástico aumenta a vulnerabilidade dos corais à dissolução, seja por alterações na química da água, seja por mecanismos fisiológicos ainda não discutidos na literatura. Outro ponto importante a ser destacado é que, no tratamento Plástico, a diminuição das taxas de calcificação e a ocorrência de dissolução líquida do esqueleto ocorreram mesmo em condições de supersaturação da aragonita (Ωarag médio de 2,41). Isso demonstra que a poluição plástica pode ter desencadeado um fator de estresse adicional à calcificação, independentemente das alterações na química do sistema carbonato, reforçando a complexidade dos efeitos da PP sobre a fisiologia dos corais.

No tratamento Acidificado + Plástico, apesar do Ωarag ter alcançado o nível de subsaturação (Ωarag = 0,95) foi observado aumento da taxa de calcificação na incubação T3 (média 0,51 ± 0,17 umol CaCO3 cm-2 h-1) em comparação às incubações T2 (média 0,23 ± 0,24 umol CaCO3 cm-2 h-1) e T1 (média 0,25 ± 0,12 umol CaCO3 cm-2 h-1), não havendo tendência à dissolução marcada por valores negativos. Este

resultado está possivelmente associado à interação química entre a acidificação e os plásticos. A acidificação pode acelerar a degradação do material plástico (Liu et al., 2024), potencializando a liberação de aditivos químicos (plastificantes, estabilizantes, entre outros) na coluna d'água. Esses compostos, por sua vez, podem modificar a alcalinidade total do meio, reduzindo-a por uma via distinta da precipitação de $CaCO_3$ (Romera-Castillo et al., 2023). Como o método da anomalia da alcalinidade assume que toda a redução da AT decorre exclusivamente da calcificação (Smith; Kinsey, 1978), a queda adicional da AT causada pelos aditivos pode estar sendo contabilizada como calcificação, resultando em uma taxa superestimada. Isso significa que a calcificação real no tratamento combinado pode ser ainda menor do que a reportada, mascarando parcialmente o verdadeiro impacto do sinergismo. O fato de o tratamento Plástico isolado não ter exibido esse mesmo padrão reforça essa ideia, uma vez que, em pH normal, a degradação do plástico e a liberação de aditivos ocorreriam de forma mais lenta. A acidificação, ao acelerar esse processo, teria potencializado o efeito justamente no tratamento combinado. Estudos futuros que quantifiquem diretamente os aditivos liberados e sua influência sobre a AT são necessários para confirmar essa interpretação.

Os dados de PPL complementam as avaliações sobre os processos metabólicos dos corais (Tabela 4; Figura 3). Embora a análise estatística não tenha revelado diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5B), os valores médios sugerem padrões distintos que merecem atenção. Os maiores níveis de PPL ocorreram para os tratamentos Plástico e Controle (1,37 ± 1,10 µmol O2.cm-2.h-1 e 1,15 ± 0,67 µmol O2.cm-2.h-1, respectivamente). O tratamento Acidificado exibiu valores inferiores às demais condições (média 0,53 ± 1,15 µmol O2.cm-2.h-1), incluindo taxas negativas, o que indica momentos em que a respiração foi superior à produção primária.

A única variação temporal estatisticamente significativa foi observada no tratamento Controle, que apresentou aumento da PPL na incubação 2 em relação à incubação 1 ($p < 0,05$; Tabela 5B). Nos demais tratamentos, as oscilações ao longo das incubações não foram significativas, mas exibiram tendências interpretáveis à luz dos estressores aplicados.

No tratamento Acidificado, a tendência de redução da PPL sugere que a acidificação pode ter atuado como fator de estresse metabólico, possivelmente elevando as taxas respiratórias do coral em relação à fotossíntese (Kaniewska et al., 2012). Essa interpretação é reforçada pelos dados de coloração (Figura 5): foi justamente nesse tratamento que se observou a maior variação de cor, refletindo um decréscimo na densidade de simbiontes. Com menos zooxantelas, a produção fotossintética tende a diminuir, enquanto a respiração do hospedeiro pode se manter ou até aumentar, seja por consumo heterotrófico, seja pelo custo energético adicional imposto pela manutenção da homeostase em condições de pH reduzido (Kaniewska et al., 2012).

Esse cenário contraria parte da literatura, que sugere que a acidificação poderia estimular a produção primária dos simbiontes em função do aumento do CO_2 dissolvido disponível para a fotossíntese (Crawley et al., 2010). No presente estudo, contudo, a tendência foi oposta, indicando que, ao menos nas condições experimentais testadas, o custo fisiológico da acidificação parece ter superado qualquer eventual benefício do maior aporte de CO_2. Embora não significativa estatisticamente, essa tendência é relevante por evidenciar que os impactos da acidificação não se restringem à calcificação, podendo se estender ao balanço entre produção e consumo de oxigênio.

O tratamento Plástico destacou-se por apresentar o valor mais elevado de PPL entre todos os tratamentos na incubação T2. O tratamento Acidificado + Plástico também mostrou aumento da PPL na incubação T2. Esse incremento generalizado na segunda incubação pode refletir uma resposta metabólica transitória dos simbiontes ao estresse,

possivelmente relacionada a uma resposta compensatória dos simbiontes, com fotoaclimatação de curto prazo diante do estresse (Romera-Castillo et al., 2018).

2) Avaliação da saúde das colônias

A eficiência fotossintética efetiva (ΔF/Fm'), medida por fluorometria PAM, não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do período experimental (Figura 4). Este resultado indica que a funcionalidade dos simbiontes fotossintéticos foi mantida no curto prazo, mesmo sob condições de acidificação e exposição às partículas plásticas. Tal dissociação entre calcificação e fotossíntese já foi documentada por Schneider e Erez (2006) que demonstraram, para Acropora eurystoma, que a calcificação pode ser significativamente reduzida pela acidificação sem que a fotossíntese seja afetada na mesma proporção. Os dados aqui obtidos estendem essa observação para um cenário de múltiplos estressores, sugerindo que as zooxantelas de Siderastrea sp. apresentam resiliência fisiológica considerável em exposições de curta duração (Hoegh-Guldberg et al., 2017).

Apesar disso, a análise da coloração das colônias revelou alterações expressivas na pigmentação (Figura 5). O tratamento Controle manteve uma área de coloração clara reduzida e estável, variando de 7,0% (T1) a 8,1% (T3). O tratamento Acidificado foi o mais afetado, com um aumento substancial da área clara: 18,4% em T1, pico de 30,7% em T2 e 24,2% em T3. Esse incremento de aproximadamente 66% em relação ao Controle reflete uma redução na densidade de microalgas simbiontes, padrão consistente com processos iniciais de branqueamento, ainda que não tenham sido observadas alterações visíveis severas nas colônias.

A variação temporal dentro do tratamento Acidificado foi estatisticamente significativa, com aumento expressivo da área clara da incubação 1 para a incubação 2 ($t = -3,459$; $p = 0,0056$), evidenciando que o branqueamento inicial se intensificou já na segunda semana de exposição. Nas comparações entre tratamentos, o Acidificado apresentou área clara significativamente maior do que o Controle tanto na incubação 2 ($t = -4,201$; $p = 0,0021$) quanto na incubação 3 ($t = -2,870$; $p = 0,0423$), confirmando que a acidificação isolada foi o principal fator associado à perda de pigmentação. Ainda na incubação 2, o Acidificado também diferiu significativamente do tratamento Acidificado + Plástico ($t = 2,808$; $p = 0,0481$), indicando que a presença do plástico no tratamento combinado não intensificou o branqueamento, pelo contrário, a área clara permaneceu inferior à observada no Acidificado isolado.

Esses dados reforçam e dialogam diretamente com os resultados de PPL descritos anteriormente. Foi justamente no tratamento Acidificado que a PPL atingiu os menores valores, com ocorrência de taxas negativas, indicando momentos em que a respiração superou a produção primária. A perda de pigmentação observada nesse tratamento sugere que a redução da densidade de simbiontes contribuiu para o declínio da fotossíntese líquida, ao mesmo tempo em que o metabolismo heterotrófico do hospedeiro pode ter se mantido elevado. Esse descompasso entre menor produção fotossintética e manutenção da respiração ajuda a explicar por que o tratamento Acidificado apresentou o pior desempenho metabólico e a maior área de coloração clara, evidenciando uma condição de estresse fisiológico mais acentuada.

O tratamento Plástico apresentou aumento gradual e moderado (14,3% em T1, 17,7% em T2 e 19,4% em T3), enquanto o tratamento Acidificado + Plástico registrou valores intermediários (11,4% em T1, 14,9% em T2 e 15,2% em T3), abaixo do Acidificado isolado, porém ainda superiores ao Controle. Embora o tratamento combinado não tenha exibido a maior perda de pigmentação, os resultados indicam que a exposição conjunta aos dois estressores ainda foi capaz de alterar a coloração das colônias, reforçando que tanto a acidificação quanto a poluição plástica afetam a saúde do holobionte, ainda que

por vias potencialmente distintas.
A ausência de correlação direta entre a perda de pigmentação e a queda na eficiência fotossintética sugere que, embora tenha havido redução na abundância de simbiontes, aqueles que permaneceram nos tecidos mantiveram sua capacidade funcional, ao menos dentro do período experimental avaliado (Mies et al., 2020).

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram, de forma inédita, que, assim como a acidificação oceânica, a poluição plástica também é capaz de comprometer a calcificação dos corais escleractíneos. Essas alterações foram observadas tanto em resposta individual quanto à exposição combinada à acidificação e ao plástico, evidenciando a importância de considerar a atuação conjunta desses estressores no contexto das mudanças ambientais que afetam os ecossistemas recifais. Além da redução das taxas de calcificação, a ocorrência de dissolução líquida dos esqueletos carbonáticos nos tratamentos acidificado e plástico, reforça a vulnerabilidade do crescimento do coral diante dessas fontes de estresse. Para o tratamento Plástico, essa condição ocorreu mesmo em condições de supersaturação da aragonita, mostrando que os prejuízos à calcificação podem ocorrem por outras vias, além das alterações na química do sistema carbonato. Acreditamos que as taxas de calcificação estimadas para o tratamento combinado (Plástico + Acidificado) possam ter sido influenciadas por decréscimos na AT decorrentes da degradação plástica potencialmente acelerada pela acidificação. Esse processo superestimar as taxas obtidas pelo método da anomalia da alcalinidade, mascarando parcialmente o efeito real da interação entre a AO e a PP.
O estresse por acidificação também provocou uma redução da PPL, acompanhada por um aumento da respiração. Esse padrão pode estar associado à perda de microalgas simbiontes, uma vez que o tratamento acidificado apresentou aumento da palidez. Esse resultado evidencia que o aumento de CO2 dissolvido nem sempre favorece os processos fotossintéticos. Nos demais tratamentos de estresse (e.g. Plástico; Plástico + Acidificado), o comprometimento da calcificação não foi acompanhado por prejuízos em PPL e na coloração do coral. Essa dissociação entre calcificação, fotossíntese e coloração revela que o comprometimento do crescimento esquelético pode ser um sinal precoce de estresse, anterior a indicadores mais visíveis de declínio da saúde coralínea, o que dificulta a detecção do problema em estágios iniciais.
Assim, ambos os estressores aqui avaliados exerceram impactos negativos relevantes sobre a calcificação, reforçando sua importância como fatores de risco para a manutenção e conservação dos recifes de coral. Estas descobertas são fundamentais para a identificação de áreas prioritárias para ações de remediação, bem como para a elaboração de estratégias de conservação eficazes que considerem tanto os níveis de acidificação quanto os níveis de poluição plástica nos ecossistemas recifais. Estudos futuros com maior duração experimental e quantificação direta dos aditivos liberados pelo plástico são recomendados para aprofundar a compreensão desses mecanismos.

Referências

ANDERSSON, A. J.; GLEDHILL, D. Ocean acidification and coral reefs: effects on breakdown, dissolution, and net ecosystem calcification. Annual Review of Marine Science, v. 5, p. 321–348, 2013.
CAI, W. J. et al. Acidification of subsurface coastal waters enhanced by eutrophication. Nature Geoscience, v. 4, n. 11, p. 766-770, 2011.
CARBONNE, C. et al. Early life stages of a Mediterranean coral are vulnerable to ocean warming and acidification. Biogeosciences, v. 19, n. 19, p. 4767-4777, 12 out. 2022.
CARMOUZE, J.-P. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher/FAPESP, 1994.
CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. Bulletin of Marine Science, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2001.
CHAPRON, L. et al. Macro-and microplastics affect cold-water corals growth, feeding and behaviour. Scientific Reports, v. 8, p. 15299, 2018.
CORNWALL, C. E. et al. Global declines in coral reef calcium carbonate production under ocean acidification and warming. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 118, n. 21, p. e2015265118, 2021.
CRAWLEY, A. et al. The effect of ocean acidification on symbiont photorespiration and productivity in Acropora formosa. Global Change Biology, v. 16, p. 851–863, 2010.
DAVIS, K. L. et al. Global coral reef ecosystems exhibit declining calcification and increasing primary productivity. Communications Earth & Environment, v. 2, p. 105, 2021.
DICKSON, A. G. Thermodynamics of the dissociation of boric acid in synthetic seawater from 273.15 to 318.15 K. Deep-Sea Research, v. 37, p. 755-766, 1990.
DICKSON, A. G.; MILLERO, F. J. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. Deep-Sea Research, v. 34, p. 1733-1743, 1987.
DICKSON, A. G. et al. Guide to best practices for ocean CO_2 measurements. PICES Special Publication, 3. Sidney: North Pacific Marine Science Organization, 2007.
DONEY, S. C. et al. Ocean acidification: the other CO_2 problem. Annual Review of Marine Science, v. 1, p. 169-192, 2009.
FEELY, R. A. et al. Acidification of the global surface ocean. Oceanography, v. 36, n. 2-3, p. 120-129, 2023.
FRIEDLINGSTEIN, P. et al. Global Carbon Budget 2024. Earth System Science Data, v. 17, n. 3, p. 965-1039, 14 mar. 2025.
GALGANI, L.; LOISELLE, S. A. Plastic pollution impacts on marine carbon biogeochemistry. Environmental Pollution, v. 268, p. 115598, 2021.
GEWERT, B.; PLASSMANN, M. M.; MACLEOD, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. Environmental Science: Processes & Impacts, v. 17, n. 9, p. 1513-1521, 2015.
GRASSHOFF, K.; KREMLING, K.; EHRHARDT, M. (Eds.). Methods of Seawater Analysis. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.
GRILLO, A. C. et al. Ocean acidification and nitrate enrichment can mitigate negative effects of soft coral (Xenia) competition on hard coral (Stylophora pistillata) endosymbionts. Scientific Reports, v. 15, n. 1, p. 29937, 15 ago. 2025.
GRUBER, N. et al. The oceanic sink for anthropogenic CO_2 from 1994 to 2007. Science, v. 363, n. 6432, p. 1193-1199, 15 mar. 2019.

HOEGH-GULDBERG, O. et al. Coral reef ecosystems under climate change and ocean acidification. Frontiers in Marine Science, v. 4, p. 158, 2017.
IPCC – INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Edited by V. Masson-Delmotte et al. Cambridge: Cambridge University Press, 2021.
KANIEWSKA, P. et al. Major cellular and physiological impacts of ocean acidification on a reef building coral. PLoS ONE, v. 7, n. 4, e34659, 2012.
KLEYPAS, J. A. Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research. Boulder: UCAR, 2006.
LANCTÔT, C. M. et al. Physiological stress response of the scleractinian coral Stylophora pistillata exposed to polyethylene microplastics. Environmental Pollution, v. 263, p. 114559, 2020.
LARTAUD, F. et al. Plastics: an additional threat for coral ecosystems. In: ROSSI, S.; BRAMANTI, L. (Eds.). Perspectives on the Marine Animal Forests of the World. Cham: Springer, 2020. p. 469-485.
LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P.; TESTA, V. Corals and coral reefs of Brazil. In: CORTÉS, J. (Ed.). Latin American Coral Reefs. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 9-52.
LEWIS, E.; WALLACE, D. W. R. Program developed for CO_2 system calculations. ORNL/CDIAC-105. Oak Ridge: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, 1998.
LINS DE BARROS, M. M. et al. Calcification rates of the massive coral Siderastrea siderea and crustose coralline algae along the Florida reef tract. Coral Reefs, v. 32, p. 987-997, 2013.
LIU, L. et al. Environmental behavior and toxic effects of micro(nano)plastics and engineered nanoparticles on marine organisms under ocean acidification: a review. Environmental Research, v. 263, p. 120267, 2024. DOI: 10.1016/j.envres.2024.120267.
MEHRBACH, C. et al. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. Limnology and Oceanography, v. 18, n. 6, p. 897-907, 1973.
MIES, M. et al. South Atlantic coral reefs are major global warming refugia and less susceptible to bleaching. Frontiers in Marine Science, v. 7, p. 514, 2020.
PORTER, J. W.; TOUGAS, J. I. Reef ecosystems: threats to their biodiversity. In: Encyclopedia of Biodiversity. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 2001. p. 73-95.
ROCHA, T. L. et al. Toxic effects of polyethylene microplastics on the tropical sea urchin Lytechinus variegatus. Chemosphere, v. 255, p. 126940, 2020.
ROMERA-CASTILLO, C. et al. Dissolved organic carbon leaching from plastics stimulates microbial activity in the ocean. Nature Communications, v. 9, p. 1430, 2018.
ROMERA-CASTILLO, C. et al. Aged plastic leaching of dissolved organic matter is two orders of magnitude higher than virgin plastic leading to a strong uplift in marine microbial activity. Frontiers in Marine Science, v. 9, p. 861557, 2022.
ROMERA-CASTILLO, C. et al. Abiotic plastic leaching contributes to ocean acidification. Science of The Total Environment, v. 854, p. 158683, 2023.
SCHNEIDER, K.; EREZ, J. The effect of carbonate chemistry on calcification and photosynthesis in the hermatypic coral Acropora eurystoma. Limnology and Oceanography, v. 51, n. 3, p. 1284-1293, 2006.
SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research, v. 10, p. 51-62, 1986.

SIEBECK, U. E. et al. Monitoring coral bleaching using a colour reference card. Coral Reefs, v. 25, n. 3, p. 453-460, 1 ago. 2006.
SMITH, S. V.; KINSEY, D. W. Calcification and organic carbon metabolism as indicated by carbon dioxide. In: STODDART, D. R.; JOHANNES, R. E. (Eds.). Coral reefs: research methods. Monographs on Oceanographic Methodology, v. 5. Paris: UNESCO, 1978. p. 469-484.
SPALDING, M.; RAVILIOUS, C.; GREEN, E. P. World Atlas of Coral Reefs. Berkeley: University of California Press, 2001.
TAMBUTTÉ, E. et al. Morphological plasticity of the coral skeleton under CO_2-driven seawater acidification. Nature Communications, v. 6, n. 1, p. 7368, 12 jun. 2015.
VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynthesis Research, v. 25, n. 3, p. 147-150, 1990.
ZEEBE, R. E.; WOLF-GLADROW, D. CO_2 in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes. Amsterdam: Elsevier, 2001.
ZILBERBERG, C. et al. (Org.). Conhecendo os recifes brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016.

Anexos

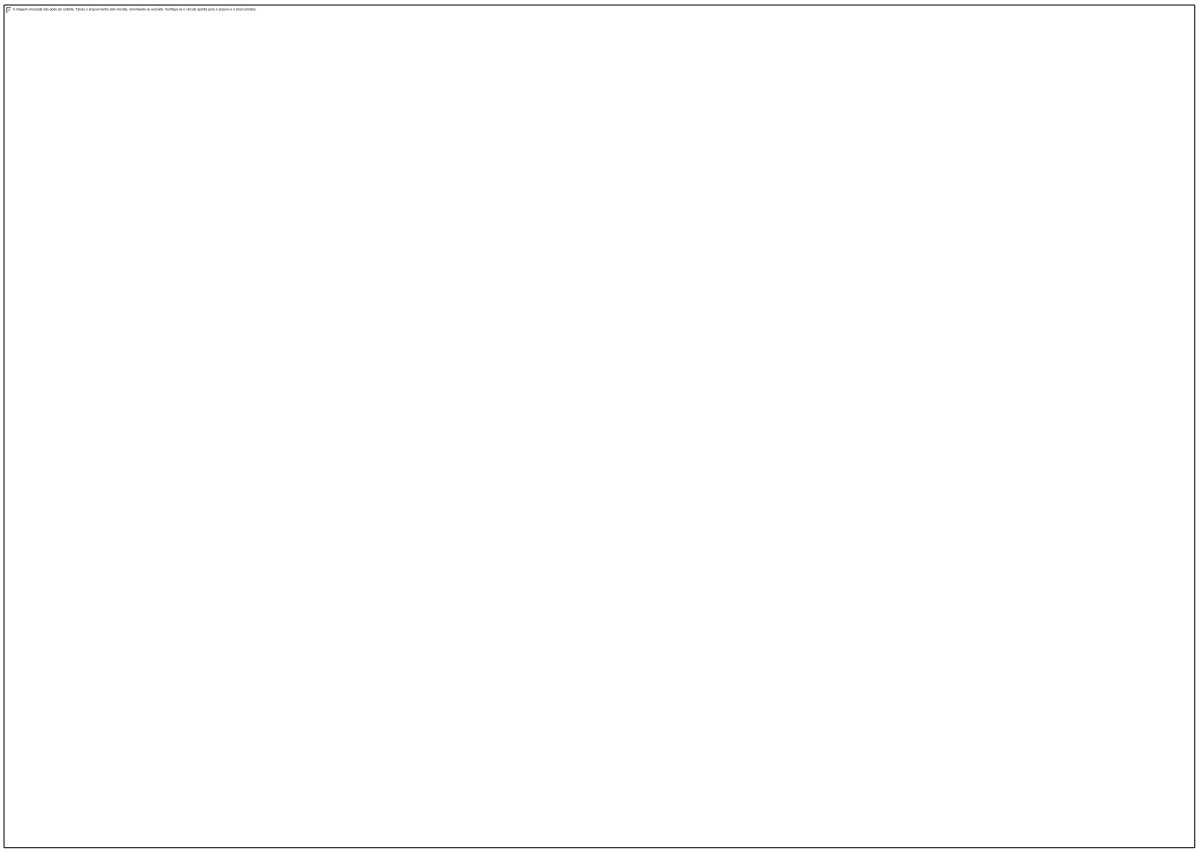


Figura 1: Esquema dos sistemas experimentais: (I) controle; (II) acidificado; (III) plástico; (IV) acidificado + plástico.



Tabela 1: Programação da intensidade de emissão luminosa nos diferentes comprimentos de onda da luminária LED Maxspect RSX 150 (160 W) ao longo do ciclo diário.



Tabela 2: Parâmetros físico-químicos médios (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) registrados nos quatro tratamentos ao longo do experimento.



Tabela 3: Parâmetros médios do sistema carbonato nos quatro tratamentos: alcalinidade total, bicarbonato, carbonato, gás carbônico dissolvido, carbono inorgânico dissolvido e saturação da aragonita.

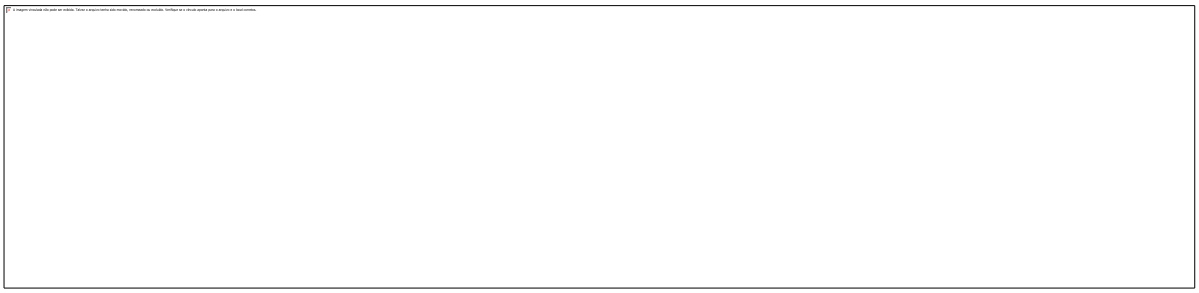


Tabela 4: Estatística descritiva das taxas de calcificação e de produção primária líquida (PPL) de Siderastrea sp. nos diferentes tratamentos experimentais.



Tabela 5: Estimativas dos efeitos dos tratamentos e das incubações sobre as taxas de calcificação e produtividade primária líquida (PPL) de Siderastrea sp., obtidas por meio de modelo linear misto.

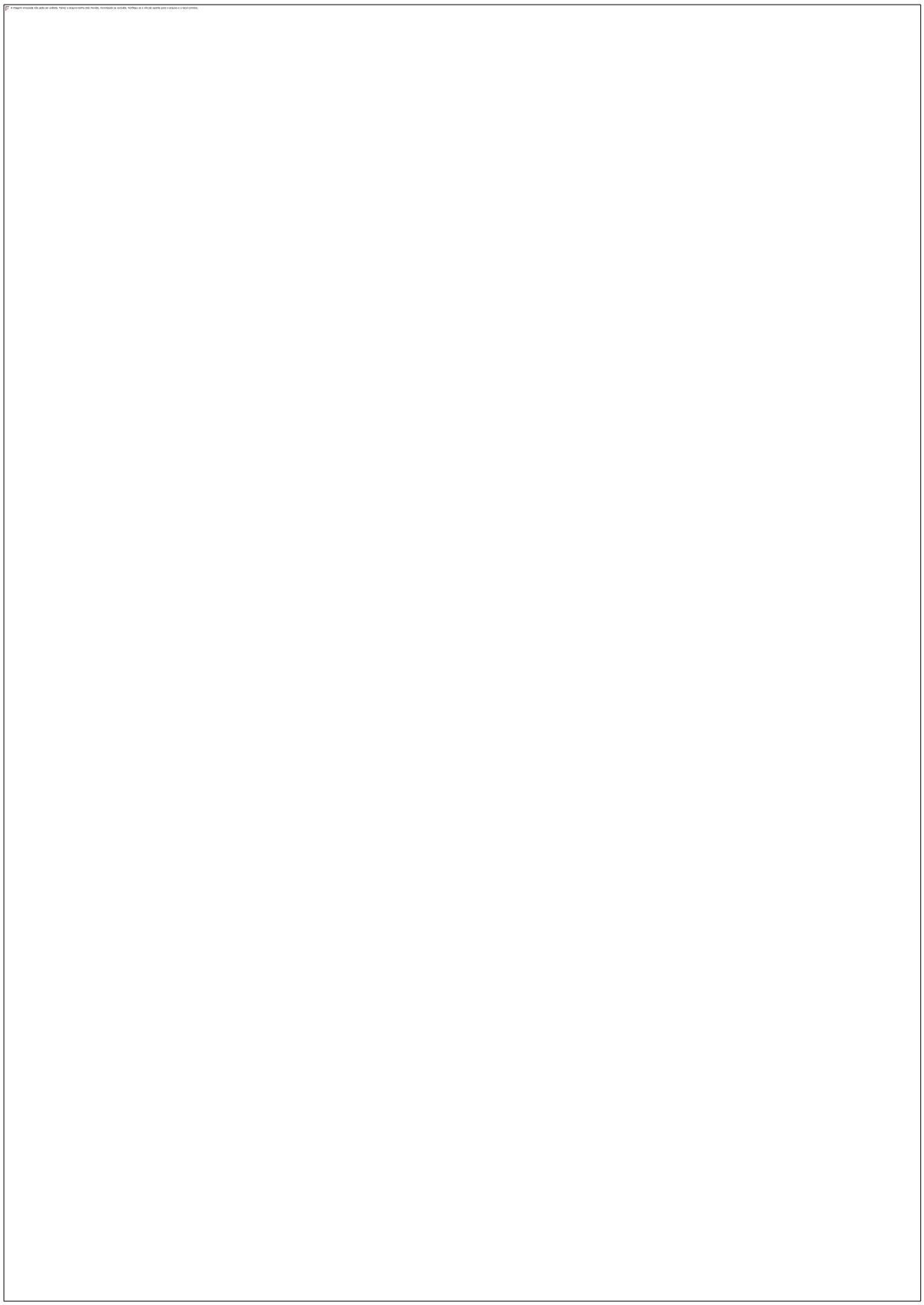


Figura 2: Taxas de calcificação de Siderastrea sp. nos quatro tratamentos ao longo das incubações T1, T2 e T3. A linha tracejada vermelha em zero separa calcificação (positivo) de dissolução (negativo).

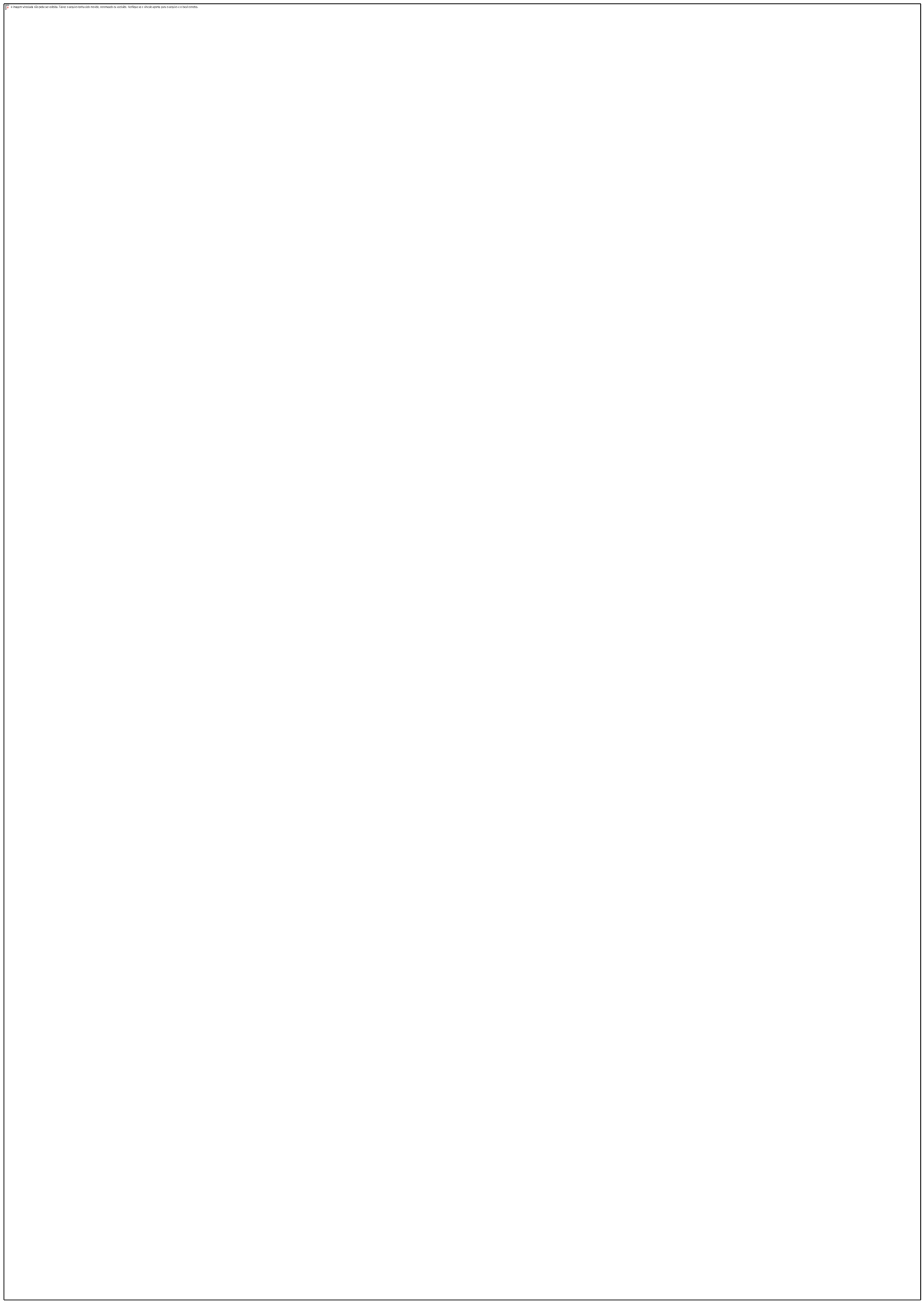


Figura 3: Produtividade primária líquida (PPL) nos quatro tratamentos durante os três momentos de incubações semanais (T1, T2 e T3). A linha tracejada vermelha em zero separa produção primária (positiva) de respiração (negativo).

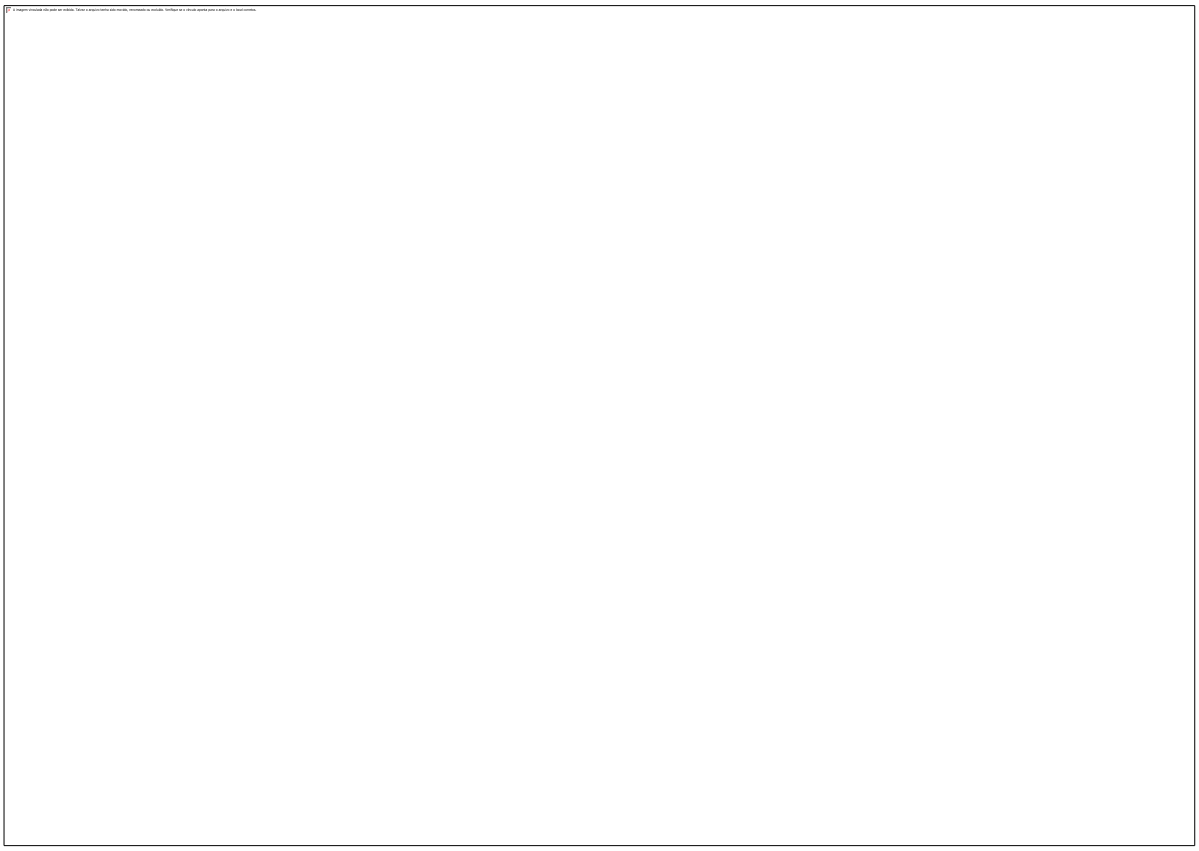


Figura 4: Eficiência fotossintética efetiva das zooxantelas nos quatro tratamentos ao longo das três semanas.

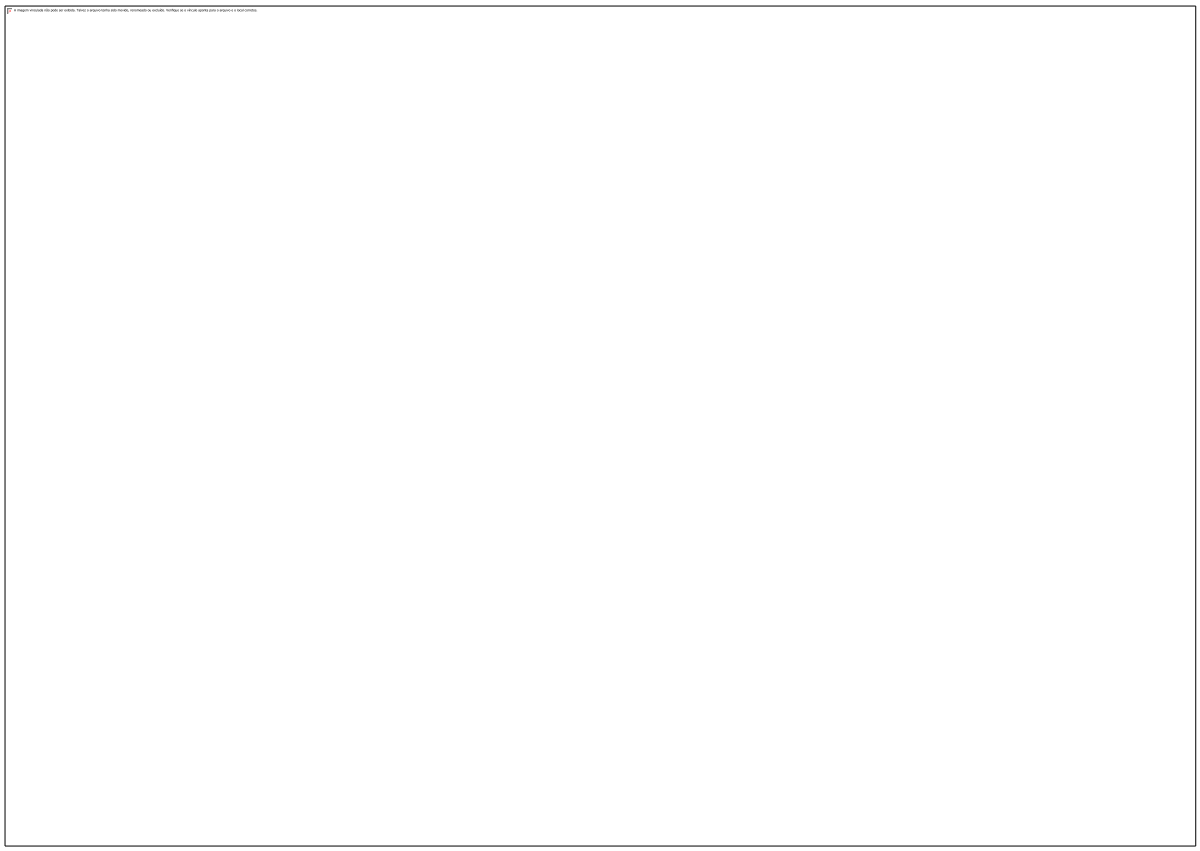


Figura 5: Porcentagem de área de coloração clara nas colônias de Siderastrea sp. nos quatro tratamentos ao longo de T1, T2 e T3, quantificada com ficha Coral Watch e ImageJ.

CÓDIGO: ET1554

AUTOR: GABRIELLA ANDRADE DA COSTA DANTAS

ORIENTADOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

TÍTULO: Poluição em recifes de corais inseridos em Áreas Marinhas Protegidas - AMPs do Brasil

Resumo

As Áreas Marinhas Protegidas (AMPs) constituem uma importante estratégia para a conservação dos ecossistemas marinhos. Entretanto, sua delimitação não garante proteção efetiva contra as pressões antrópicas, incluindo a contaminação por poluentes químicos. Este trabalho avaliou a qualidade ambiental de recifes de corais inseridos em seis Áreas Marinhas Protegidas (AMPs) brasileiras por meio de indicadores geoquímicos de contaminação.Foram realizadas coletas de água e sedimento entre janeiro e junho de 2025 para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos, metais, metaloides, HPAs e esteróis fecais. Os resultados indicaram diferentes gradientes de qualidade ambiental entre as AMPs, com sinais de contaminação por esgoto doméstico, principalmente em Fernando de Noronha, onde foram observadas concentrações de nutrientes acima dos limites estabelecidos. Os HPAs indicaram predominância de fontes petrogênicas em algumas áreas, possivelmente associadas à navegação, enquanto os metais classificaram os sedimentos entre não impactados a moderadamente impactados. A REVIS do Arquipélago de Alcatrazes apresentou os melhores indicadores ambientais. Os resultados reforçam que, apesar da importância das AMPs para a conservação dos recifes, esses ambientes permanecem sujeitos às pressões antrópicas, destacando a necessidade de ações de saneamento e gestão ambiental integrada.

Palavras-chave: Ecossistemas recifais; Conservação; Eutrofização; Esgoto.

TITLE: Pollution in coral reefs located within Marine Protected Areas (MPAs) in Brazil.

Abstract

Marine Protected Areas (MPAs) constitute an important strategy for the conservation of marine ecosystems. However, their delimitation does not guarantee effective protection against anthropogenic pressures, including contamination by chemical pollutants. This work evaluated the environmental quality of coral reefs located within six Brazilian Marine Protected Areas (MPAs) through geochemical indicators of contamination. Water and sediment samples were collected between January and June 2025 for the analysis of dissolved inorganic nutrients, metals, metalloids, PAHs, and fecal sterols. The results indicated different gradients of environmental quality among the MPAs, with signs of contamination by domestic sewage, mainly in Fernando de Noronha, where nutrient concentrations above the established limits were observed. PAHs indicated a predominance of petrogenic sources in some areas, possibly associated with navigation, while metals classified the sediments as ranging from unimpacted to moderately impacted. The REVIS of the Alcatrazes Archipelago presented the best environmental indicators. The results reinforce that, despite the importance of MPAs for the conservation of reefs, these environments remain subject to anthropogenic pressures, highlighting the need for sanitation actions and integrated environmental management.

Keywords: Reef ecosystems; Conservation; Eutrophication; Sewage.

Introdução

Os recifes de corais estão entre os ecossistemas mais biodiversos do planeta, abrigando cerca de 25% das espécies marinhas conhecidas, embora ocupem menos de 1% do fundo oceânico (Spalding et al., 2001; Côté & Reynolds, 2006). Sua elevada diversidade resulta da estrutura tridimensional formada pelos corais construtores, organismos capazes de secretar carbonato de cálcio e criar habitats que oferecem abrigo, alimento, áreas de reprodução, proteção para inúmeros organismos, sustentando complexas interações ecológicas (Spalding et al., 2001). Além da importância para a biodiversidade, os recifes desempenham funções ecossistêmicas essenciais, atuando como barreiras naturais que reduzem a energia das ondas, minimizando erosão, inundações costeiras e danos à infraestrutura litorânea, além de sustentarem atividades pesqueiras (Spalding et al., 2001). Em geral, esses desenvolvem-se em ambientes oligotróficos e mantêm associação simbiótica com zooxantelas, algas fotossintetizantes responsáveis por fornecer grande parte da energia necessária ao metabolismo dos corais (Fabricius, 2005).

Entretanto, alterações nas condições ambientais, como o enriquecimento por nutrientes, lançamento de esgoto doméstico, presença de metais potencialmente associados à navegação e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), provenientes da queima de combustíveis fósseis, derramamentos de petróleo e intenso tráfego de embarcações, podem comprometer esse equilíbrio ecológico (Van Dam et al., 2011). O excesso de nutrientes favorece a proliferação de macroalgas, que competem com os corais por luz, espaço e recursos. Esse processo pode romper a associação com as zooxantelas, desencadeando o branqueamento dos corais (Fabricius, 2005). Esteróis fecais, como o coprostanol, são amplamente utilizados como indicadores de contaminação por esgoto doméstico, permitindo identificar a influência de aportes de origem antrópica nesses ambientes (Bujagić et al., 2016) . Além dos efeitos associados ao enriquecimento por

nutrientes, a presença de poluentes químicos pode provocar diferentes alterações nos organismos e nas comunidades recifais. Hidrocarbonetos derivados de petróleo, incluindo os HPAs, podem afetar processos como sobrevivência, reprodução, crescimento e metabolismo dos organismos, enquanto os metais podem apresentar efeitos sobre sobrevivência, crescimento, comportamento e reprodução, dependendo do contaminante, da concentração e do tempo de exposição. Exposições agudas, como derramamentos de petróleo e acidentes relacionados à navegação, os efeitos podem ser severos e atingir diferentes níveis tróficos, enquanto exposições crônicas podem provocar efeitos subletais e reduzir a capacidade de resposta dos organismos a outros estressores ambientais (Van Dam et al., 2011).

As Áreas Marinhas Protegidas (AMPs) representam uma importante estratégia para conservar a biodiversidade e os habitats marinhos (Mello et al., 2025; Rivera & Wenger, 2026) . Entretanto, muitas permanecem sujeitas a pressões externas, como ocupação costeira, lançamento de efluentes, turismo desordenado e navegação, fatores que podem comprometer a qualidade da água e dos sedimentos e reduzir a efetividade das ações de conservação (Mello et al., 2025; Rivera & Wenger, 2026) . Nesse contexto, o monitoramento da qualidade ambiental por meio de marcadores geoquímicos de poluição é fundamental para identificar fontes de contaminação e seus impactos sobre os ecossistemas recifais (Mello et al., 2025) . Assim, este estudo avaliou a qualidade ambiental de recifes localizados em seis Áreas Marinhas Protegidas brasileiras por meio da análise de indicadores químicos da água e do sedimento, buscando identificar possíveis fontes de contaminação e fornecer subsídios para o aprimoramento das estratégias de conservação e gestão dessas unidades.

Metodologia

Com o objetivo de avaliar a qualidade ambiental dos ecossistemas recifais, foram coletadas amostras de água e sedimento, utilizadas para caracterizar as condições físico-químicas do ambiente e identificar possíveis fontes de contaminação. As coletas foram realizadas entre janeiro e junho de 2025 em ecossistemas recifais inseridos em seis Áreas Marinhas Protegidas (AMPs) distribuídas ao longo da costa brasileira: Reserva Biológica Marinha do Arvoredo (SC), Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes (SP), Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e Área de proteção ambiental Ponta da Baleia (BA), Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais (AL e PE), Área de Proteção Ambiental dos Recifes de Corais (RN) e Parque Nacional Marinho e Área de Proteção Ambiental de Fernando de Noronha (PE). Essas unidades de conservação representam importantes ecossistemas recifais brasileiros, distribuídos em diferentes regiões do litoral e submetidos a diferentes níveis de influência antrópica.

. Após a coleta, as amostras de água foram filtradas em membranas de porosidade de 0,45 um, acondicionadas em recipientes de polietileno e mantidas congeladas até o momento das análises. As amostras de sedimento foram acondicionadas em recipientes previamente descontaminados e mantidas congeladas até o processamento das análises, minimizando riscos de contaminação e alterações nas amostras.

As análises de nutrientes dissolvidos foram realizadas para avaliar a qualidade da água por meio da determinação de nutrientes inorgânicos dissolvidos, como ortofosfato, nitrito, nitrato, N-amoniacal e ortosilicato. A determinação foi realizada por métodos colorimétricos utilizando o espectrofotômetro UV/VIS SHimadzu 1900i (Grasshoff, 2009). Os níveis de nutrientes encontrados nas amostras foram comparados aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005.

A avaliação da qualidade dos sedimentos foi realizada a partir da determinação das concentrações de metais (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) e do metalóide arsênio (As), utilizando ICP-MS para identificação e quantificação desses elementos na matriz sedimentar. Também foram analisados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e esteróis fecais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), permitindo avaliar a presença desses compostos orgânicos no sedimento. Os HPAs foram utilizados como indicadores de contaminação por óleo e derivados de petróleo, enquanto os esteróis fecais foram empregados como indicadores de influência de esgoto doméstico no ambiente. Para interpretar os possíveis impactos ambientais, foi aplicado o índice Sediment Quality Guideline (SQGq), utilizado para avaliar os níveis de alteração dos sedimentos em relação às concentrações de metais e HPAs (MacDonald et al., 1996). Além disso, foram utilizadas razões diagnósticas para auxiliar na identificação das possíveis fontes dos contaminantes orgânicos, incluindo HPAs e esteróis (Bujagic et al., 2016; Tobiszewski e Namiesnik, 2012).

Resultados e Discussões

Nutrientes dissolvidos

As concentrações dos nutrientes inorgânicos dissolvidos variaram entre as Áreas Marinhas Protegidas (AMPs), refletindo diferentes condições de qualidade da água e distintos níveis de influência antrópica.

Nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_4^+$)

O nitrogênio amoniacal apresentou ampla variação entre as áreas estudadas. As menores concentrações foram observadas na APA Costa dos Corais (AL/PE), variando de valores não detectáveis a 0,64 µM, e no REVIS do Arquipélago de Alcatrazes (SP), entre 0,01 e 7,06 µM. Na REBIO do Arvoredo (SC), as concentrações variaram entre 0,5 e 21,3 µM, permanecendo abaixo do limite estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005 (28,6 µM).

Na APA Ponta da Baleia (BA), o composto não foi detectado nas amostras analisadas, enquanto no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (BA) foi detectado em apenas uma amostra, atingindo 3,31 µM. Na APARC (RN), observou-se maior variabilidade temporal, com concentrações máximas próximas de 28,8 µM na campanha de janeiro e aumento expressivo na campanha de maio de 2025, alcançando valores superiores a 70 µM. Em Fernando de Noronha (PE), foram registradas as maiores concentrações,

destacando-se a estação Rio Boldró, com 167,7 µM, aproximadamente seis vezes acima do limite estabelecido pela legislação.

As diferenças observadas entre as AMPs podem estar relacionadas à dinâmica do ciclo do nitrogênio, incluindo a decomposição da matéria orgânica, assimilação biológica e transformações microbianas. Concentrações elevadas também podem refletir aportes terrestres e de esgoto, fontes reconhecidas de pressão sobre ambientes recifais (Fabricius, 2005; Rivera & Wenger, 2026).

Na APARC, o aumento observado em maio de 2025 pode indicar um aporte ou alteração temporária no processamento do nitrogênio. Já em Fernando de Noronha, especialmente em Rio Boldró, a concentração elevada evidencia maior disponibilidade de N-amoniacal no sistema, podendo representar uma fonte adicional de pressão sobre o ambiente. Resultados recentes também apontam a ocorrência de enriquecimento por nutrientes e influência de águas residuárias em áreas marinhas protegidas, incluindo Fernando de Noronha (Mello et al., 2025).

Nitrito (NO_2^-)

As concentrações de nitrito permaneceram reduzidas na maior parte das áreas avaliadas. No REVIS Alcatrazes, variaram entre 0,18 e 0,20 µM; na REBIO Arvoredo, entre 0,18 e 0,49 µM; na APA Costa dos Corais, entre 0,18 e 0,23 µM; na APA Ponta da Baleia, entre 0,19 e 0,24 µM; e no PARNA Abrolhos, entre 0,18 e 0,20 µM, permanecendo muito abaixo do valor de referência de 5,0 µM estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

Na APARC, o nitrito permaneceu próximo de zero durante todas as campanhas. Em contraste, em Fernando de Noronha, a estação Rio Boldró apresentou concentração máxima de 7,02 µM, ultrapassando o valor de referência estabelecido pela legislação. A distribuição das concentrações máximas de nitrito entre as AMPs é apresentada na Figura 2.

As baixas concentrações de nitrito observadas na maioria das AMPs são compatíveis com sua rápida transformação no ciclo do nitrogênio, especialmente durante a nitrificação, na qual o N-amoniacal é oxidado a nitrito e, posteriormente, a nitrato. Na APARC, a concentração próxima de zero, mesmo diante do aumento expressivo de $N\text{-}NH_4^+$ observado em maio de 2025, pode estar relacionada à rápida transformação do nitrito no sistema ou à ausência de acúmulo desse composto. Embora esse padrão possa ocorrer em situações associadas a aportes de nitrogênio, os dados disponíveis não permitem determinar sua origem.

Em contraste, a concentração de 7,02 µM registrada em Rio Boldró, em Fernando de Noronha, destacou-se das demais áreas e ultrapassou o valor de referência. Esse resultado indica uma alteração na dinâmica local do nitrogênio e merece atenção por ocorrer em uma área recifal, onde alterações na disponibilidade de nutrientes podem interferir no equilíbrio do ecossistema (Fabricius, 2005; Mello et al., 2025).

Nitrato (NO_3^-)

O nitrato apresentou baixas concentrações no REVIS Alcatrazes (não detectado–0,42 µM), na REBIO Arvoredo (0,39–1,37 µM) e na APA Costa dos Corais (0,1–0,2 µM). Na APA Ponta da Baleia e no PARNA Abrolhos, as concentrações variaram entre 7,37–11,36 µM e 0,29–6,75 µM, respectivamente, permanecendo abaixo do valor de referência de 28,6 µM estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

Na APARC, foram registrados aumentos nas campanhas de março e maio de 2025, com concentrações máximas de 28,6 µM, atingindo o valor de referência estabelecido pela legislação. Em Fernando de Noronha, a estação Rio Boldró apresentou 28,55 µM, valor muito próximo ao limite estabelecido. A distribuição das concentrações máximas de nitrato entre as AMPs é apresentada na Figura 3.

As baixas concentrações de nitrato observadas na maioria das AMPs indicam menor disponibilidade dessa forma de nitrogênio, possivelmente relacionada à assimilação biológica e à dinâmica de transformação do nitrogênio no ambiente. Na APARC, os aumentos registrados em março e maio de 2025, atingindo 28,6 µM, sugerem maior disponibilidade de nitrato e podem estar relacionados a alterações temporais nos aportes ou no processamento do nitrogênio. Em Fernando de Noronha, o valor de 28,55 µM em Rio Boldró, próximo ao valor de referência, também indica maior disponibilidade desse nutriente no sistema.

A ocorrência de concentrações elevadas de diferentes formas de nitrogênio em uma mesma área merece atenção, especialmente em ambientes recifais, nos quais alterações na disponibilidade de nutrientes podem estar associadas a aportes terrestres e outras pressões antrópicas (Fabricius, 2005). Em Fernando de Noronha, a ocorrência de concentrações elevadas de compostos nitrogenados também é consistente com resultados recentes que identificaram sinais de enriquecimento por nutrientes e influência de águas residuárias na área protegida (Mello et al., 2025).

Ortofosfato (PO_4^{3-})

As concentrações de ortofosfato permaneceram baixas na maioria das Áreas Marinhas Protegidas (AMPs), indicando reduzida disponibilidade dessa forma de fósforo dissolvido. Na REVIS do Arquipélago de Alcatrazes (SP), as concentrações variaram entre 0,02 e 0,43 µM, enquanto na REBIO do Arvoredo (SC) os valores oscilaram entre 0,01 e 0,34 µM.

Na APA Costa dos Corais (AL/PE), o ortofosfato foi quantificado em apenas uma amostra, com concentração de 0,02 µM, permanecendo abaixo do limite de quantificação nas demais. Situação semelhante foi observada no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (BA), onde todas as amostras permaneceram abaixo do limite de quantificação. Na APA Ponta da Baleia (BA), as concentrações variaram entre 0,005 e 0,01 µM, enquanto na APARC (RN) os valores permaneceram próximos de zero durante todas as campanhas.

Em contraste, Fernando de Noronha (PE) apresentou concentração muito superior às demais áreas, destacando-se a estação Rio Boldró, onde foi registrada concentração de 45,6 µM. Esse resultado indica elevada disponibilidade de fósforo dissolvido no local. Ressalta-se, entretanto, que os resultados não foram comparados diretamente à Resolução CONAMA nº 357/2005, uma vez que a legislação estabelece padrões para

fósforo total, e não especificamente para ortofosfato. A distribuição das concentrações máximas é apresentada na Figura 4.

As baixas concentrações de ortofosfato observadas na maioria das AMPs são compatíveis com a elevada demanda biológica por fósforo em ambientes marinhos, onde esse nutriente pode ser rapidamente assimilado pelos organismos. Em contraste, a concentração elevada observada em Rio Boldró indica uma condição distinta das demais áreas e pode estar relacionada a maior disponibilidade de matéria orgânica ou a aportes antrópicos. O aumento da disponibilidade de nutrientes, especialmente em ambientes recifais naturalmente pobres em nutrientes, pode favorecer o crescimento de algas e alterar o equilíbrio entre corais e organismos competidores (Fabricius, 2005).

A diferença observada em Fernando de Noronha também merece atenção quando considerada em conjunto com os resultados de nitrogênio apresentados anteriormente. A ocorrência de concentrações elevadas de diferentes nutrientes pode indicar uma alteração na disponibilidade de nutrientes no ambiente e reforça a importância do monitoramento dessas áreas, especialmente diante de possíveis fontes antrópicas de aporte (Mello et al., 2025).

Ortossilicato (SiO_4^{4-})

O ortossilicato apresentou maior variabilidade entre as AMPs quando comparado aos demais nutrientes dissolvidos. Na REVIS do Arquipélago de Alcatrazes (SP), as concentrações variaram entre 1,35 e 2,31 µM, enquanto na REBIO do Arvoredo (SC) oscilaram entre 0,5 e 2,43 µM.

Na APA Costa dos Corais (AL/PE), os valores variaram entre 0,88 e 5,19 µM. No Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (BA), as concentrações ficaram entre 1,78 e 12,23 µM, representando a maior amplitude entre as áreas que apresentaram concentrações relativamente baixas. Na APA Ponta da Baleia (BA), o ortossilicato variou entre 1,29 e 6,52 µM.

Na APARC (RN), foram observadas variações entre as campanhas, com concentrações entre 0,88 e 3,21 µM. Em Fernando de Noronha (PE), novamente a estação Rio Boldró apresentou os maiores valores registrados, variando entre 55,5 e 68,9 µM. A distribuição das concentrações mínimas e máximas de ortossilicato entre as AMPs é apresentada na Figura 5.

As maiores variações de ortossilicato entre as AMPs podem estar relacionadas a diferenças nos aportes e na dinâmica de retenção, transformação e disponibilidade do silício no ambiente. Na maioria das áreas, as concentrações permaneceram relativamente baixas, enquanto em Fernando de Noronha, especialmente em Rio Boldró, foram registrados valores muito superiores aos das demais AMPs. Esse resultado é consistente com o padrão de maior disponibilidade de nutrientes observado anteriormente para o nitrogênio e o fósforo, embora os dados não permitam determinar a origem do ortossilicato.

Os valores elevados registrados em Rio Boldró podem estar relacionados a maior aporte de silício ou a processos locais de ressuspensão e disponibilidade desse elemento. Entretanto, como a Resolução CONAMA nº 357/2005 não estabelece valores de

referência para compostos de silício, os resultados foram utilizados exclusivamente para caracterizar a disponibilidade desse nutriente e as diferenças entre as AMPs.

Esteróis

A análise das razões diagnósticas entre esteróis fecais permitiu avaliar a possível origem da matéria orgânica presente nos sedimentos, distinguindo contribuições predominantemente naturais daquelas associadas a fontes antrópicas. A utilização conjunta de coprostanol, colestanol e epicoprostanol é uma abordagem empregada na identificação de possíveis aportes de esgoto doméstico, uma vez que diferentes razões entre esses esteróis podem indicar alterações associadas à presença de matéria fecal e ao grau de transformação dessa matéria orgânica no ambiente (Bujagić et al., 2016).

De modo geral, a distribuição das amostras indicou predominância de condições classificadas como de origem mista, caracterizadas pela presença de esteróis de origem natural associada a possíveis contribuições antrópicas (Figura 6). Esse padrão sugere que a ocorrência de esteróis fecais nos sedimentos não está necessariamente relacionada a uma fonte exclusiva de esgoto, podendo refletir a combinação entre matéria orgânica natural e diferentes graus de influência antrópica.

A predominância de amostras classificadas como de origem mista indica que os esteróis presentes nos sedimentos podem resultar da combinação entre fontes naturais e antrópicas, com diferentes graus de influência entre as áreas. Os indícios de aporte de esgoto doméstico observados nos Abrolhos, Arvoredo e Costa dos Corais tornam-se especialmente relevantes quando associados aos resultados dos nutrientes dissolvidos, uma vez que o aporte de águas residuárias pode contribuir simultaneamente para o enriquecimento por nutrientes e para a introdução de esteróis de origem fecal.

Em Fernando de Noronha e na APARC, a classificação como áreas sob influência de esgoto bruto ou insuficientemente tratado reforça a possibilidade de contribuição de efluentes para o enriquecimento observado, particularmente diante dos maiores valores de N-amoniacal, nitrato e ortofosfato identificados nessas áreas. A influência de águas residuárias sobre ambientes costeiros pode representar uma pressão adicional mesmo em áreas formalmente protegidas, especialmente quando existem fontes de poluição provenientes das regiões costeiras adjacentes (Mello et al., 2025; Rivera & Wenger, 2026).

Assim, a análise conjunta dos esteróis fecais e dos nutrientes dissolvidos permite uma interpretação mais abrangente das condições ambientais das Áreas Marinhas Protegidas. Enquanto os nutrientes indicam o enriquecimento da água, os esteróis auxiliam na identificação de uma possível contribuição associada ao esgoto doméstico. Dessa forma, os resultados sugerem a ocorrência de pressões antrópicas espacialmente localizadas, com maior evidência nas áreas em que as razões diagnósticas indicaram influência de esgoto doméstico.

Metais e metalóides

A qualidade dos sedimentos foi avaliada pelas concentrações de metais e metaloides (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn e As), que podem apresentar origem natural, associada às características geológicas, ou antrópica, relacionada a efluentes, atividades industriais

e movimentação de embarcações. A avaliação foi realizada pelo índice SQG-q e pelos valores de PEL (Probable Effect Level), permitindo uma avaliação conjunta do grau de alteração dos sedimentos e da possibilidade de ocorrência de efeitos adversos à biota (MacDonald et al., 1996).

Na Área de Proteção Ambiental Costa dos Corais (APACC), parte das amostras apresentou condição “moderadamente impactada” (0,1 < SQG-q < 1,0), principalmente pela contribuição de Ni e As, com concentrações máximas de 14 mg kg^{-1}. Entretanto, os valores permaneceram abaixo do PEL, não indicando efeitos adversos prováveis à biota segundo esse critério. Em Fernando de Noronha, todas as estações foram classificadas como “moderadamente impactadas”, principalmente em função de As, Ni e Cr. No Rio Boldró, Cr (191,4 µM) e Ni (65,3 µM) ultrapassaram os valores de PEL, indicando potencial de efeitos adversos à biota.

No PARNA dos Abrolhos e APA Ponta da Baleia (BA), 35% das amostras apresentaram condição “moderadamente impactada”, com maior contribuição de Cr, Zn e Ni, cujas concentrações máximas foram de 47, 29 e 18 mg kg^{-1}, respectivamente. Apesar disso, os valores permaneceram abaixo do PEL, não indicando efeitos adversos prováveis à biota. Na APARC (RN), parte das amostras também foi classificada como “moderadamente impactada”, principalmente pela contribuição de As, Cr e Ni, que atingiram concentrações máximas de 12,68, 26,57 e 13,99 mg kg^{-1}, respectivamente. Todos os valores permaneceram abaixo do PEL.

De modo geral, Cr, Ni e As foram os elementos que mais contribuíram para as alterações observadas na qualidade dos sedimentos. A predominância da classificação “não impactado” em algumas áreas e a ocorrência de condições “moderadamente impactadas” em outras demonstram que as alterações não ocorreram de forma homogênea entre as AMPs. A presença desses elementos pode estar relacionada tanto às características naturais dos sedimentos quanto a contribuições antrópicas, sendo necessária a interpretação conjunta com os demais indicadores ambientais para uma melhor compreensão de suas possíveis fontes.

Embora condições moderadamente impactadas tenham sido observadas em diferentes AMPs, a ultrapassagem dos valores de PEL foi identificada apenas em Fernando de Noronha, especialmente no Rio Boldró, indicando maior potencial de efeitos adversos à biota nessa área. Dessa forma, a classificação pelo SQG-q demonstra alterações na qualidade dos sedimentos em diferentes áreas, mas a comparação com o PEL indica que, na maioria delas, as concentrações dos elementos avaliados permaneceram abaixo dos níveis associados a efeitos adversos prováveis. Fernando de Noronha constitui, portanto, a principal área de atenção entre as AMPs avaliadas, especialmente em relação às concentrações de Cr e Ni observadas no Rio Boldró.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Além dos contaminantes inorgânicos, a qualidade dos sedimentos foi avaliada quanto à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos orgânicos utilizados como indicadores de contaminação associada a derivados de petróleo e a processos de combustão. A avaliação foi realizada por meio do índice SQG-q, associado às razões diagnósticas, que permitem identificar possíveis fontes desses compostos, diferenciando contribuições petrogênicas, relacionadas ao petróleo e seus derivados, de

fontes pirolíticas, associadas à queima de combustíveis fósseis e biomassa (MacDonald et al., 1996; Tobiszewski & Namieśnik, 2012).

De modo geral, os resultados indicaram baixo risco associado aos HPAs, com predominância de áreas classificadas como não impactadas pelo SQG-q (Figura 9). Entretanto, algumas localidades apresentaram assinaturas predominantemente petrogênicas, sugerindo influência pontual de derivados de petróleo. Esse padrão pode estar relacionado a atividades associadas à navegação e ao tráfego de embarcações, que constituem possíveis fontes de hidrocarbonetos em ambientes costeiros.

A predominância da classificação não impactada pelo SQG-q sugere baixa probabilidade de ocorrência de efeitos adversos associados aos HPAs na maior parte das áreas avaliadas. Entretanto, a identificação de assinaturas petrogênicas em algumas localidades indica que, embora não tenha sido observada uma condição generalizada de impacto, existem contribuições pontuais de compostos associados ao petróleo e seus derivados. Dessa forma, os resultados apontam para uma influência localizada de fontes petrogênicas, possivelmente relacionadas à navegação e ao tráfego de embarcações, reforçando a importância da análise conjunta entre os critérios de qualidade dos sedimentos e as razões diagnósticas para a interpretação das possíveis fontes de HPAs.

Conclusão

A criação de Áreas Marinhas Protegidas representa um importante passo para a conservação dos recifes de corais, mas, por si só, não garante que esses ambientes estejam livres dos impactos causados pelas atividades humanas. Os resultados deste estudo mostram que, mesmo protegidos por lei, esses ecossistemas continuam sofrendo influência da ocupação costeira, do lançamento de esgoto doméstico, da navegação e de outras fontes de poluição. Isso evidencia que a conservação dos recifes depende não apenas da existência dessas áreas, mas também de ações contínuas de monitoramento, gestão e preservação.

Ao longo deste trabalho, a utilização conjunta de diferentes marcadores geoquímicos permitiu uma avaliação mais completa da qualidade ambiental das seis Áreas Marinhas Protegidas estudadas. Enquanto os nutrientes dissolvidos forneceram informações sobre o enriquecimento da água, os esteróis fecais possibilitaram identificar a influência de esgoto doméstico, e os metais, metaloides e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) contribuíram para compreender a qualidade dos sedimentos e as possíveis fontes de contaminação, essa abordagem integrada mostrou que diferentes indicadores se complementam e oferecem um diagnóstico mais confiável das condições ambientais.

Mais do que identificar áreas com maior ou menor grau de impacto, este estudo reforça a necessidade de acompanhar continuamente a qualidade ambiental dos ecossistemas recifais. As informações obtidas podem contribuir para o planejamento de ações voltadas ao saneamento, à redução das fontes de poluição e ao fortalecimento das estratégias de gestão das Áreas Marinhas Protegidas. Dessa forma, espera-se colaborar para que esses ambientes continuem desempenhando seu papel na conservação da

biodiversidade marinha, na proteção das zonas costeiras e na manutenção dos serviços ecossistêmicos dos quais inúmeras espécies e comunidades humanas dependem.

Referências

Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 16 maio 2011. Seção 1, p. 89-91.

Bujagić, I. M., Grujić, S., Jauković, Z., & Laušević, M. (2016). Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia. Environmental Pollution, 213, 76-83.

Fabricius, K. E. (2005). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. Marine pollution bulletin, 50(2), 125-146.

Macdonald, D. D., Carr, R. S., Calder, F. D., Long, E. R., & Ingersoll, C. G. (1996). Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. Ecotoxicology, 5(4), 253-278.

Mello, T. J., Longhini, C. M., Wanderley, B. M. S., da Silva, C. A., Lehrback, B. D. C., Bom, F. C., ... & Longo, G. O. (2025). Pollution affects even oceanic marine protected areas in Southwestern Atlantic. Environmental Pollution, 366, 125485.

Rivera, D. E. C., & Wenger, A. S. (2026). Wastewater pollution undermines coastal marine protection: Implications for 30x30 and effective conservation. Ocean & Coastal Management, 276, 108150.

Tobiszewski, M., & Namieśnik, J. (2012). PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. Environmental pollution, 162, 110-119.

Anexos



Figura 1 – Concentração máxima de N-amoniacal (NH_4^+) por Área Marinha Protegida (AMP).



Figura 2 – Concentração máxima de nitrito (NO_2^-) por Área Marinha Protegida (AMP).



Figura 3 – Concentração máxima de nitrato (NO_3^-) por Área Marinha Protegida (AMP).

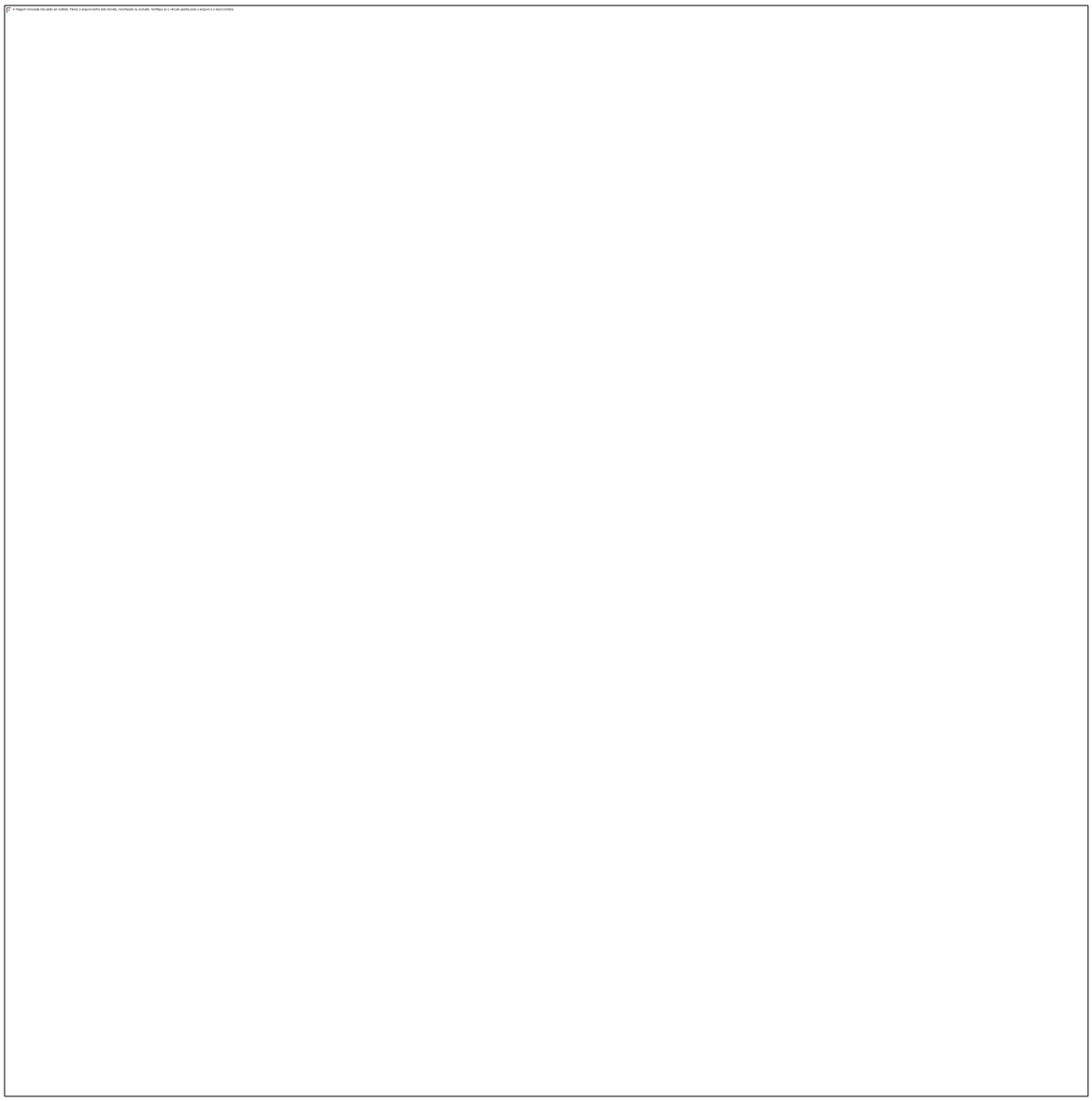


Figura 4 – Concentração máxima de ortofosfato (PO_4^{3-}) nas Áreas Marinhas Protegidas (AMPs).



Figura 5 – Distribuição das concentrações de ortossilicato (SiO_4^{4-}) nas Áreas Marinhas Protegidas (AMPs).

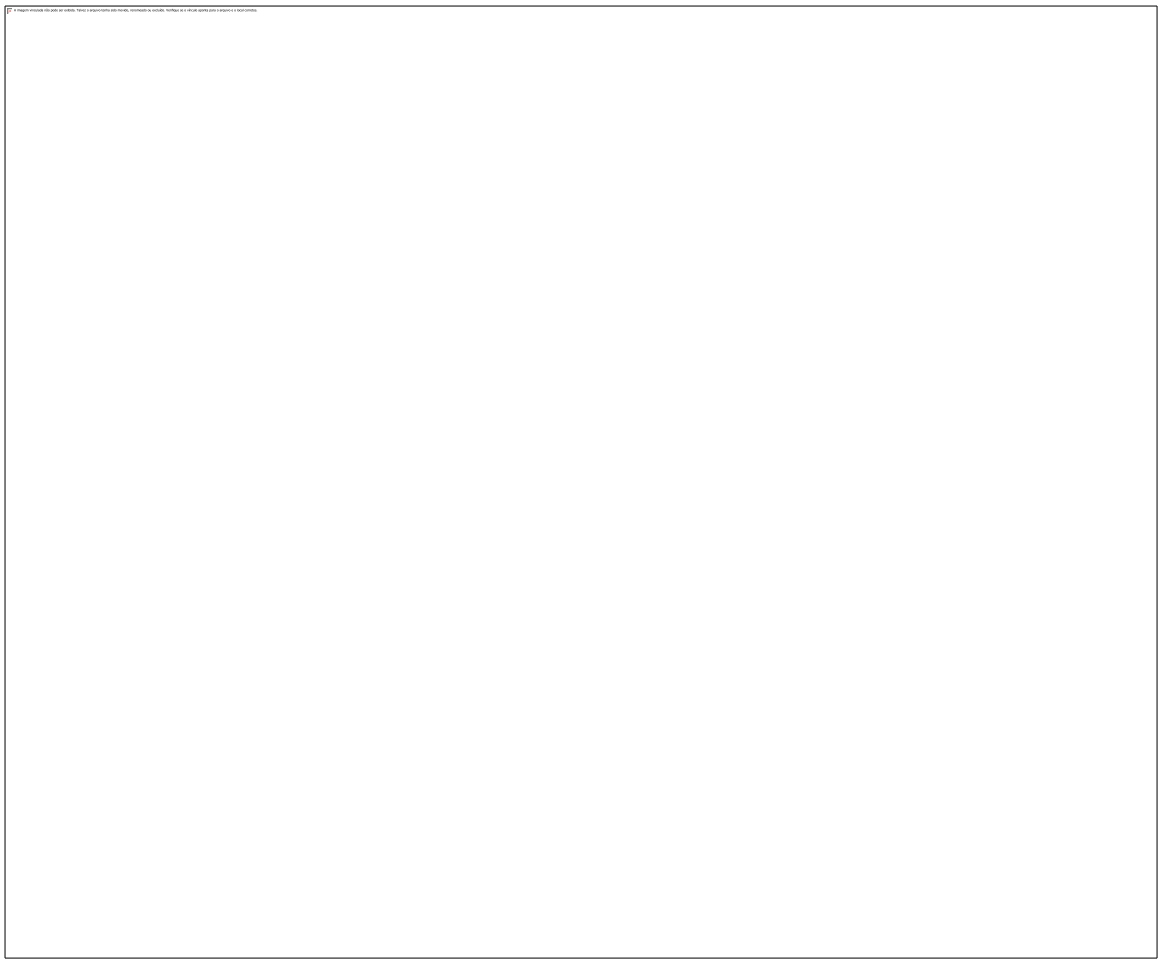


Figura – Distribuição das amostras segundo as razões diagnósticas entre coprostanol, colestanol e epicoprostanol, utilizadas para a avaliação da possível origem da matéria orgânica nos sedimentos.

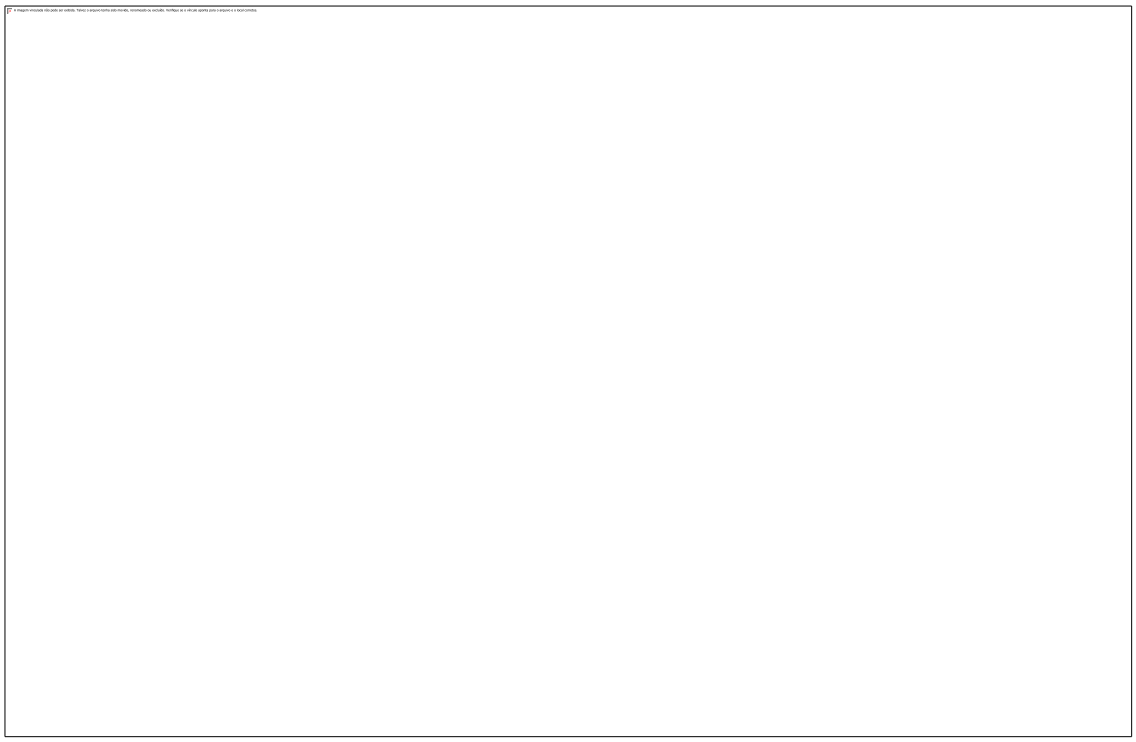


Figura 7 – Classificação das Áreas Marinhas Protegidas quanto ao grau de impacto dos sedimentos, segundo o índice SQG-q.



Figura 8 – Síntese visual da classificação dos sedimentos quanto aos HPAs pelo índice SQG-q e das possíveis fontes indicadas pelas razões diagnósticas.

CÓDIGO: HS0260

AUTOR: ANDRIELLY REBECA VENANCIO DE LIMA

ORIENTADOR: ROVENA CLARA GALVAO JANUARIO ENGELBERTH

TÍTULO: Ratos, Relógios, Ração e ação: Como o Estresse Crônico Social e o restrição temporal alimentar podem trabalhar quando colocados juntos.

Resumo

O isolamento social prolongado, como o vivido durante a pandemia, foi um estressor crônico com grande impacto na saúde mental. A falta de convívio afetou profundamente o comportamento das pessoas, sendo associada ao aumento de sintomas de ansiedade e depressão. No entanto, a resposta ao estresse não é igual para todo mundo: mulheres, por exemplo, tendem a ser mais vulneráveis a esses transtornos, possivelmente por conta da ação dos hormônios sexuais sobre o sistema de resposta ao estresse, como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Além disso, as cromoterapias têm sido amplamente estudadas como estratégias para o tratamento de alterações de humor. Nesse contexto, a restrição temporal alimentar entra como estratégia capaz de sincronizar os osciladores periféricos, e consequentemente, os ritmos circadianos. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da TRF em um modelo animal de depressão por isolamento social. Para isso, os sujeitos experimentais desses estudos serão ratos (Rattus novergicus) Wistar machos e fêmeas divididos em grupos controle e experimental da seguinte forma: Grupo restrição alimentar (G1); Grupo fármaco (G2); Grupo TRF + fármaco (G3); Grupo estresse social + TRF (G4);Grupo estresse social + fármaco (G5). Esses grupos serão duplicados levando em consideração a idade e sexo. As tarefas comportamentais analisadas serão nado forçado, respingo de sacarose, interação social, campo aberto e esquiva discriminativa. As estatísticas serão realizadas usando statsoft®.

Palavras-chave: Estresse. isolamento. depressão. diferenças sexuais. cronoterapia

TITLE: Rats, Clocks, Rations, and Action: How Chronic Social Stress and Time-Restricted Feeding Work Together

Abstract

Prolonged social isolation, such as that experienced during the COVID-19 pandemic, is a chronic stressor that significantly affects mental health. Social isolation has been associated with increased symptoms of anxiety and depression, with women showing greater vulnerability, possibly due to the effects of sex hormones on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Time-restricted feeding (TRF) has emerged as a potential

chronotherapeutic strategy capable of synchronizing peripheral oscillators and circadian rhythms. This study aims to evaluate the effects of TRF in an animal model of depression induced by social isolation. Male and female Wistar rats (Rattus norvegicus) will be allocated to five groups: food restriction (G1), pharmacological treatment (G2), TRF + pharmacological treatment (G3), social stress + TRF (G4), and social stress + pharmacological treatment (G5). Groups will be replicated according to sex and age. Behavioral assessment will include the forced swim, sucrose splash, social interaction, open-field, and discriminative avoidance tests. Statistical analyses will be performed using STATISTICA StatSoft®.

Keywords: Stress; social isolation; depression; sex differences; chronotherapy

Introdução

Durante o período da pandemia da Covid-19, a população global foi submetida a mudanças drásticas de rotina, devida a súbita e crítica disseminação do vírus SARS-CoV-2, que resultou na determinação emergencial de um isolamento social obrigatório 1. A Covid-19 não apenas acometeu os indivíduos de maneira orgânica e ou física provenientes da contaminação viral, mas provocou efeitos psicossociais que refletem na população até os dias atuais 2. Se apresentou como uma das causas para o aumento exponencial de síndromes neuropsiquiátricas, incluindo a depressão 3,4. A depressão é um transtorno neuropsiquiátrico que acomete cada vez mais a população, sendo considerada uma das doenças mais incapacitantes do mundo 5,6. Diversas teorias têm sido propostas na literatura para explicar a etiopatogenia da depressão, entre elas são evidenciados o papel da inflamação 7. Segundo essa hipótese, alterações metabólicas e linfáticas acarretam na liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias e essa resposta exacerbada está relacionada com alterações neuroquímicas em estruturas que regulam o humor, contribuindo para a manifestação dos sintomas depressivos 8. Mais recentemente, tem-se discutido uma nova hipótese que envolve a conexão entre o intestino e o cérebro como parte da origem da depressão. A microbiota é formada por um conjunto de microrganismos presentes no trato gastrointestinal que participam de uma série de processos essenciais para a saúde humana e o sistema imunológico, além de desempenharem papel importante na comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro 14. A disbiose está relacionada com aumento da inflamação, alterações na produção de neurotransmissores e metabólitos que estão associados ao desenvolvimento da depressão 15,16,17. O isolamento social, definido como redução física do convívio social, tem se destacado como um dos fatores responsáveis pelo estresse crônico e fator de risco para a saúde mental e física 18, 19, 20, 21. O estresse por isolamento social é destacado na etiologia da depressão tanto em modelos animais 22 como em humanos 23. O estresse crônico induz modificações plásticas em estruturas cerebrais chave envolvidas em processos cognitivos e emocionais 24, 25, 26, 27. Além das alterações neuroquímicas, o estresse crônico e a depressão estão associados a alterações na organização dos ritmos circadianos, podendo comprometer a sincronização temporal de diferentes processos fisiológicos. Essas alterações podem contribuir para a manifestação e manutenção dos sintomas depressivos, estabelecendo uma relação bidirecional entre a desregulação circadiana e os transtornos do humor. Essa associação também é observada em indivíduos submetidos a alterações frequentes no ciclo sono-vigília, como trabalhadores de turno, nos quais a perturbação dos ritmos circadianos está relacionada a maior risco de alterações de humor e sintomas depressivos28. Nesse contexto, as

cronoterapias têm sido investigadas como estratégias terapêuticas capazes de atuar sobre a organização temporal dos ritmos biológicos e, consequentemente, sobre alterações associadas aos transtornos do humor 29. Entre essas abordagens, destaca-se a restrição temporal alimentar (time-restricted feeding – TRF), caracterizada pela delimitação de uma janela diária para a ingestão alimentar, seguida por um período prolongado de jejum. A TRF atua como um importante sinal temporal para os relógios circadianos periféricos, podendo favorecer a sincronização dos ritmos metabólicos e circadianos 30.Além disso, alterações no padrão alimentar e na organização temporal das refeições podem influenciar a comunicação entre os relógios periféricos e o sistema nervoso central, repercutindo sobre processos metabólicos, inflamatórios e neuroquímicos envolvidos na regulação do humor 31. Assim, considerando a associação entre o estresse por isolamento social, a depressão e a desregulação circadiana, a TRF apresenta-se como uma estratégia potencial para a modulação dessas alterações.

Metodologia

Sujeitos da pesquisa:

Serão utilizados ratos (Rattus novergicus) Wistar machos e fêmeas, com idade de aproximadamente 3-4 meses para jovens e idade entre 16-18 meses para os idosos. O ciclo estral das ratas será avaliado por esfregaço vaginal. Esses animais serão provenientes do biotério central do Centro de Biociências da UFRN, onde adotaremos todos os cuidados estabelecidas pela Lei Arouca de cuidado animal (Lei nº 11.794, de 2008) durante as atividades de pesquisa para evitar qualquer estresse ou sofrimento durante o manuseio dos animais. Além disso, esse projeto será submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFRN) e suas atividades só irão iniciar após a aprovação. Os animais serão divididos em grupos controle e experimental da seguinte forma: Grupo restrição alimentar (G1); Grupo fármaco (G2); Grupo TRF + fármaco (G3); Grupo estresse social + TRF (G4);Grupo estresse social + fármaco (G5). Esses grupos serão duplicados levando em consideração a idade e sexo.

Modelo de estresse social:

O protocolo de estresse será realizado conforme descrito por Yates et al. (1991). Resumidamente, durante dias consecutivos os animais serão alojados em gaiolas individuais com isolamento social total e acústico para evitar vocalizações sociais. A quantidade de dias será definida pelo piloto, mas de acordo com a literatura pode ter uma duração de 7 a 14 dias 32. Enquanto isso, os animais do grupo controle irão permanecer em suas gaiolas. A condição de isolamento persistirá até 24h antes das tarefas comportamentais.

Protocolo restrição temporal alimentar:

O tempo de disponibilidade da ração vai ser reduzido a um período de 8 horas (durante o período de atividade dos animais), iniciando às 12:00 p.m. até às 20:00, diferente dos demais animais sem RA que possuirão comida de forma ad libitum.

Tarefas comportamentais e Fármaco:

Serão utilizados alguns testes já validados pela literatura, a saber - teste de nado forçado 33 ;respingo de sacarose 44; teste de interação social 35 e teste de respingo de sacarose 36. Os animais também serão submetidos a tarefas para avaliar comportamento do tipo ansioso. Nesse protocolo utilizaremos o teste de campo aberto e o de esquiva discriminativa 37. Por fim, os animais passarão por tarefas que observam aspectos cognitivos para avaliar aprendizagem/ memória. Para isso, utilizaremos a tarefa de esquiva discriminativa do labirinto em cruz (esse teste também fornece informações simultâneas de ansiedade) 38 e o teste de reconhecimento de objetos 39, e será verificado se esses aspectos também são prejudicados. O fármaco utilizado será a Fluoxetina, como controle positivo aos tratamentos de sintomas depressivos.

Análises estatísticas:

Os dados serão testados para normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov, para homogeneidade de variâncias usando o teste de Levene. O estudo irá utilizar o teste de ANOVA com medidas repetidas três fatores, se necessário com correção post hoc Tukey para amostras iguais ou desiguais (unequal Tukey's test). A análise de covariância (ANCOVA) será realizada para controlar o efeito do ciclo estral e da ansiedade sobre os parâmetros comportamentais. Por último, os tamanhos de efeito serão calculados para ANOVA usando eta-square ($\eta 2$). Os resultados são expressos como média ± desvio ou erro padrão. As diferenças estatísticas serão consideradas significativas para $p \leq 0,05$. Toda a análise será realizada usando STATISTICA statsoft®.

Resultados e Discussões

O trabalho ainda esta em execução. Contudo, os resultados esperados se baseiam na efetividade da implementação do comportamento depressivo proveniente do protocolo de estresse. Esse modelo demonstra excelente validade, tornando-o especialmente relevante no contexto da pandemia, em que é evidente a relação entre o isolamento social e o desenvolvimento de síndromes neuropsiquiátricas 21. Além disso, já foi demonstrado que o estresse social em roedores produz sintomas tanto ansiosos como depressivos 27.

Como também, espera-se que a restrição temporal alimentar (TRF) atenue essas alterações comportamentais e neurobiológicas, uma vez que essa estratégia tem demonstrado efeitos benéficos sobre comportamentos tipo-depressivos e marcadores de neuroinflamação em modelos experimentais associados à desregulação circadiana 28.

Conclusão

Na literatura, o isolamento social é reconhecido como um importante fator de risco para o desenvolvimento de alterações comportamentais e neurobiológicas associadas aos transtornos do humor, tendo seus efeitos sido especialmente evidenciados durante a pandemia de COVID-19. Nesse contexto, torna-se relevante compreender os mecanismos pelos quais o estresse decorrente do isolamento social contribui para o desenvolvimento de alterações tipo-depressivas, incluindo a participação da neuroinflamação e da desregulação dos ritmos circadianos. Considerando que a organização temporal da alimentação pode atuar como um importante sinal para o sistema circadiano, a restrição temporal alimentar (TRF) apresenta-se como uma estratégia não farmacológica potencialmente capaz de modular alterações comportamentais e neurobiológicas associadas ao estresse social.

Referências

1- DE SOUSA, I. L. M. et al. O impacto do isolamento social na saúde mental dos idosos brasileiros (ansiedade e depressão) durante a pandemia de COVID-19. Frontiers in Psychiatry, v. 13, 888234, 8 set. 2022. DOI: 10.3389/fpsyt.2022.888234. PMID: 36159941; PMCID: PMC9493187.

2- FIORILLO, A.; GORWOOD, P. As consequências da pandemia de COVID-19 na saúde mental e implicações para a prática clínica. European Psychiatry, v. 63, n. 1, e32, 1 abr. 2020. DOI: 10.1192/j.eurpsy.2020.35. PMID: 32234102; PMCID: PMC7156565.

3- DURANKUŞ, F.; AKSU, E. Effects of the COVID-19 pandemic on anxiety and depressive symptoms in pregnant women: A preliminary study. Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, v. 35, n. 2, p. 205–211, 2022.

4-GONÇALVES, A. P. et al. Preliminary findings on the associations between mental health indicators and social isolation during the COVID-19 pandemic. Archives of Psychiatry and Psychotherapy, v. 22, n. 2, p. 10-19, 2020.

5-ZHANG, H.; ZHAI, L.; ZHANG, D. et al. Sleep duration and depression among adults: A meta-analysis of prospective studies. Depression and Anxiety, v. 32, n. 9, 2015.

6-LIU, Q. et al. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. Journal of psychiatric research, v. 126, p. 134-140, 2020.

7- KIECOLT-GLASER, J. K.; DERRY, H. M.; FAGUNDES, C. P. Inflammation: depression fans the flames and feastes on the heat. American Journal of Psychiatry, v. 172, n. 11, p. 1075-1091, 2015.KUHLA, A. et al. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. PloS one, v. 8, n. 7, 2013.

8- GUERRERO-VARGAS, N. N. et al. Time-restricted feeding prevents depressive-like and anxiety-like behaviors in male rats exposed to an experimental model of shift-work. Journal of Neuroscience Research, v. 99, n. 2, p. 604–620, 2021..

15- CARLESSI, Anelise S et al. Gut microbiota-brain axis in depression: The role of neuroinflammations, the european journal of neuroscience vol 53,1 (2021)

16- EVRENSEL, A.; CEYLAN, M. E. The gut-brain axis: the missing link in depression. Clinical Psychopharmacology and Neuroscience, v. 13, n. 3, p. 239, 2015.

17-EVRENSEL, A.; ÖNEN ÜNSALVER, B.; CEYLAN, M. E. Therapeutic potential of the microbiome in the treatment of neuropsychiatric disorders. Medical Sciences, v. 7, n. 2, p. 21, 2019.

18-GOODMAN, L. A. et al. Recent victimization in women and men with severe mental illness: prevalence and correlates. Journal of traumatic stress, v. 14, n. 4, p. 615-632, 2001,

19- MATTHEWS, T. et al. Social isolation, loneliness and depression in young adulthood: a behavioural genetic analysis. Social psychiatry and psychiatric epidemiology, v. 51, n. 3, p. 339-348, 2016.

20- GE, L. et al. Social isolation, loneliness and their relationships with depressive symptoms: a population-based study. PloS one, v. 12, n. 8, p. e0182145, 2017.

21- USHER, K.; BHULLAR, N.; JACKSON, D. Life in the pandemic: Social isolation and mental health. Journal of Clinical Nursing, v. 29, n. 15-16, p. 2756-2757, 2020.

22- DJORDJEVIC, J. et al. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. Neuropsychobiology, v. 66, n. 2, p. 112-119, 2012.

23- TEO, A. R.; CHOI, H. J.; VALENSTEIN, M. Social relationships and depression: Ten-year follow-up from a nationally representative study. PLoS ONE, v. 8, n. 4, e62396, 2013.

24- FERNANDES, I. M. O. P. et al. Sex differences in response to chronic mild stress in the forced swimming and open field tests: Subchronic fluoxetine treatment and the influence of the estrous cycle in rats. Psychology & Neuroscience, [s. l.], 2025. Publicação antecipada online.

25- HOLSON, R. R. et al. “Isolation stress” revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. Physiology & behavior, v. 49, n. 6, p. 1107-1118, 1991.

26- MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDAO, M. L. Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. Physiology & behavior, v. 54, n. 4, p. 753-758, 1993.

27- BARROT, M. et al. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102, n. 23, p. 8357-8362, 2005.

28-Guerrero-Vargas NN, Zárate-Mozo C, Guzmán-Ruiz MA, Cárdenas-Rivera A, Escobar C. Time-restricted feeding prevents depressive-like and anxiety-like behaviors in male rats exposed to an experimental model of shift-work. J Neurosci Res. 2021 Feb;99(2):604-620. doi: 10.1002/jnr.24741. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33078850.

29-Journal of Biological Rhythms, v. 36, n. 6, p. 503-531, 2021. DOI: 10.1177/07487304211044301

30- MANOOGIAN, Emily N. C. et al. Time-restricted feeding for health benefits. Endocrine Reviews, v. 43, n. 2, p. 405-436, 2022. DOI: 10.1210/endrev/bnab027.

31-CURRENTI, Walter et al. Time restricted feeding and mental health: a review of possible mechanisms on affective and cognitive disorders. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 72, n. 6, p. 723-733, 2021. DOI: 10.1080/09637486.2020.1866504.

32- YATES, G.; JURASKA, J. M.; GABRIEL, K. I. Social isolation effects on the “behavioral despair” (forced swimming) test: Effect of age and duration of testing. Physiology & Behavior, v. 49, n. 2.

33 - PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. L. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

34- DAVID, D. J. et al. Behavioral effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression are mediated by both neurogenesis-dependent and independent mechanisms. Neuron, v. 62, n. 4, p. 479, 2009.

35- TÓTH, I.; NEUMANN, I. D. Animal models of social avoidance and social fear. Cell and Tissue Research, v. 354, n. 1, p. 107–118, 2013.

36- ROYCE, J. R. On the construct validity of open field measures. Psychological Bulletin, [s. l.], 1977. (Artigo em publicação em 1977).

37-SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: A new model to study memory–anxiety interactions. Journal of Neuroscience Methods, v. 102, p. 117–125, 2000.

38- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behavioural brain research, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.39-GRIPPO, A. J. et al. Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. Psychoneuroendocrinology, v. 32, n. 8-10, p. 966-980, 2007.

CÓDIGO: HS0629

AUTOR: MARÍLIA SOARES FERNANDES

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: PADRÕES DE EXPLORAÇÃO E MUDANÇA DE DECISÃO NO FORRAGEIO DE DINOPONERA QUADRICEPS

Resumo

O uso de heurísticas reduz a demanda cognitiva durante o forrageamento animal. Em formigas eussociais, a flexibilidade comportamental permite alternar estratégias para otimizar a busca por recursos. Este estudo avaliou como a aquisição de informação adicional afeta a precisão e as decisões de *Dinoponera quadriceps*. Para isso, 38 operárias foram testadas em um labirinto em "Y" sob protocolo de recompensa alternada em seis ensaios, analisando-se as heurísticas (Go Last vs. Go Different) e a exploração dupla (Double Check). A execução do Double Check reduziu a taxa de acerto formal no ensaio seguinte e ocorreu majoritariamente (67,6%) associada à heurística Go Last, refletindo a fidelidade ao local (site fidelity). Embora a exploração dupla diminua a precisão no modelo alternado, a reavaliação constante garante a obtenção do recurso, demonstrando uma solução de baixo custo cognitivo e alta eficiência adaptativa para a sobrevivência da colônia.

Palavras-chave: Ponerinae. Cognição. Solução de problemas. Forrageio ótimo.

TITLE: EXPLORATION PATTERNS AND DECISION-MAKING SHIFTS IN THE FORAGING OF DINOPONERA QUADRICEPS

Abstract

The use of heuristics reduces cognitive demand during animal foraging. In eusocial ants, behavioral flexibility allows individuals to switch strategies to optimize resource acquisition. This study evaluated how the gathering of additional information affects decision-making accuracy and choices in *Dinoponera quadriceps*. To test this, 38 workers were evaluated in a Y-maze under an alternating reward protocol across six trials, analyzing heuristic adoption (Go Last vs. Go Different) and double-exploration behavior (Double Check). Engaging in a Double Check reduced formal accuracy in the subsequent trial and occurred predominantly (67.6%) alongside the Go Last heuristic, reflecting site fidelity. Although double exploration lowered performance under the imposed alternating setup, constant environmental reevaluation consistently secured the

resource. This mechanism demonstrates a low-cost cognitive solution with high adaptive efficiency for colony survival.

Keywords: Ponerinae; Cognition; Problem solving; Optimal foraging.

Introdução

A heurística pode ser definida como uma regra algorítmica simples usada para tomar decisões ou resolver problemas de forma rápida e eficiente, geralmente com informações limitadas (Hutchinson & Gigerenzer, 2005). Comumente a heurística é utilizada em modelos matemáticos ligados à teoria da otimização, onde as heurísticas foram desenvolvidas para melhorar a eficiência da busca, seja por meio da economia de tempo ou da redução das demandas computacionais e de memória (Mhatre & Robert, 2018). No entanto, as heurísticas também estão presentes em estratégias comportamentais que os animais podem utilizar para se adaptar e sobreviver, como é o caso das formigas que recorrem a esse mecanismo para resolverem problemas complexos sem muito gasto energético, inclusive durante seleção de locais para nidificação (Mallon & Franks, 2000) e forrageamento (Oberhauser et al. 2020). Além do uso de heurísticas de navegação, a tomada de decisão em insetos frequentemente envolve uma mudança dinâmica de estratégia comportamental ditada pela integração de múltiplos estímulos em tempo real (Ritzmann et al. 2012). Em algumas espécies de formiga, observa-se uma clara mudança de estratégia de orientação modulada dinamicamente em relação à navegação de longa distância, comumente esses insetos adotam uma estratégia de caráter essencialmente mecânico e visual, confiando em mecanismos como a integração de caminhos, a bússola solar, a direção do vento e a polarização da luz (Gilad et al., 2023). Essa flexibilidade demonstra como os insetos conseguem alternar dinamicamente suas táticas de navegação conforme as demandas espaciais se transformam. O forrageio corresponde a uma atividade crucial para a sobrevivência animal, envolvendo busca, armazenamento ou ingestão e processos pós-ingestão de recursos (Pyke, 2010). Este comportamento requer uma tomada de decisão contínua e um fluxo sequencial de ações, nas quais o animal precisa equilibrar a distância e o valor do recurso obtido (Ayers et al., 2015). A teoria do forrageio ótimo propõe que, ao longo do processo evolutivo, os animais desenvolvem estratégias de busca por comida que maximizam o seu sucesso reprodutivo e a transmissão de seus genes (fitness), ajustando suas decisões de alimentação às suas limitações físicas e biológicas (Pyke, 1984). Em animais que vivem em grupos, como os insetos eussociais, essa atividade é designada à uma classe específica (i.e. castas). Em formigas, por exemplo, o forrageamento é feito exclusivamente pela casta das operárias (Wilson, 1979), uma classe especializada de indivíduos. Diferentes espécies de formigas exibem estratégias de forrageamento variadas, o que melhora a busca por recursos e a sobrevivência da colônia (Saar et al., 2017). Dentre as formas de forrageamento apresentadas por esses animais, podemos dividir principalmente em dois tipos: cooperativo, busca por alimento/recursos e, grupo e/ou recrutamento; e o solitário, onde as operárias realizam o forrageio individualmente e depois retornam ao ninho (Traniello, 1989). Essa última forma é consideravelmente comum entre as formigas da subfamília Ponerinae, como a espécie do nosso estudo a Dinoponera quadriceps Kempf, 1971. As operárias de Dinoponera quadriceps exploram ambientes complexos onde os recursos podem estar distribuídos espacialmente de forma imprevisível (Araújo e Rodrigues,

2006). A espécie em questão apresenta fidelidade direcional idiossincrática (Azevedo et al., 2014), sendo um indicativo de que essas formigas são capazes de registrar a localidade em que encontram recurso. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se a obtenção de informação adicional feita pelos indivíduos durante o experimento influencia na taxa de acerto a cada tentativa. Buscou-se também avaliar como o acúmulo de dados sobre o ambiente altera a precisão das escolhas ao longo dos ensaios, identificando se a experiência prévia reduz a ocorrência de erros ou se induz a reavaliações constantes na tomada de decisão.

Metodologia

Metodologia

Captura, criação das colônias e individualização dos sujeitos experimentais

Cinco colônias de *Dinoponera quadriceps* foram coletadas na Floresta Nacional de Nísia Floresta (6°5'S, 35°12'O) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença no 88316-1). Após a captura, as colônias foram mantidas em ninhos de gesso dentro de arenas (1m²). Posteriormente, as formigas foram individualizadas por meio da marcação com cores.

Aparato experimental

Todo o processo experimental foi realizado em laboratório, utilizando um labirinto em acrílico com forma de "Y" que foi conectado à arena contendo o ninho, através de uma passagem acessível às forrageadoras(figura 2). Uma câmera (Microsoft LifeCam 720) foi posicionada em posição ortogonal sobre a bifurcação do labirinto, conectada a um computador permitindo o registro por meio de vídeos.

Um total de 38 formigas (C9: 7; C10: 8; C11: 7; C13: 8; C16: 8), foram utilizadas no experimento. Antes do início dos treinos, as formigas foram aclimatadas por 2 dias, tendo acesso livre ao labirinto, mas sem nenhuma oferta. Para estimular a saída de operárias da colônia para forrageio na arena, comida (frango) foi ofertada para a colônia a priori. Para garantir que apenas operárias forrageadoras, e no correto estado emocional para o experimento fossem usadas, foi permitido a própria volição dos animais. Após a entrada de uma das formigas, o acesso fora manualmente fechado.

Para assegurar que as formigas não iriam usar memórias de médio ou longo prazo (Hammer; Menzel, 1995) em suas decisões, todos os ensaios para cada indivíduo foram realizados em sequência, no mesmo dia, totalizando 6 ensaios por indivíduo. Durante o primeiro ensaio, foi ofertado um pequeno pedaço de frango (massa média: 0,11 ± 0,027 g) ao final de ambos os braços do labirinto. A partir do segundo ensaio, a posição da oferta era alternada em cada tentativa. Ou seja, se uma formiga escolhia o lado direito na primeira tentativa, a oferta seria colocada no lado esquerdo na tentativa seguinte, e assim sucessivamente. Um ensaio fora considerado completo apenas após a operária entrar em contato com a oferta e caminhar de volta ao ninho. Para evitar que as formigas pudessem

usar possíveis marcas químicas, o labirinto foi higienizado com álcool 70% após cada ensaio.

Análise dos vídeos

As formigas foram classificadas conforme a estratégia que adotavam: para aquelas que escolheram o lado onde acharam comida da última vez, a heurística adotada era considerada “go last”. Já para as formigas que escolhiam o lado oposto ao que havia comida anteriormente a heurística era anotada como “go different”, seguindo o padrão usado por (Oberhauser e colaboradores, 2020).

Os vídeos gravados durante o experimento foram revisados novamente, com o intuito de entender se a visita aos dois lados do labirinto após a primeira decisão interferia na heurística usada e/ou taxa de acerto na próxima tentativa. Desse modo, o observador contabilizou para cada ensaio o comportamento de visitar ambos os lados do labirinto - esse comportamento foi registrado como “Double Check”. O comportamento de 'Double Check' foi definido como qualquer interação do animal com a segunda cafeteria depois de ele já ter chegado à recompensa no lado oposto."

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas usando o software R, assumindo um nível de significância de 0,05. Para investigar os fatores associados à ocorrência de double check, foram construídos quatro modelos lineares generalizados mistos (glmm), utilizando o pacote glmmTMB, sob distribuição binomial, incluindo a identidade individual dos sujeitos experimentais como fator randômico para corrigir a interdependência entre observações. Os modelos testaram, respectivamente, o efeito da sequência de ensaios (valor percebido), da estratégia heurística identificada, da interação entre estratégia e sequência de ensaios, e da marcação de feromônio sobre a ocorrência de double check. A seleção do modelo mais parcimonioso foi feita por meio do critério de informação de Akaike corrigido (AICc), com o pacote MuMIn. Para o modelo selecionado, a significância dos efeitos foi avaliada com um teste de Wald tipo II (pacote car), e as comparações par a par entre os níveis da estratégia heurística foram realizadas com o pacote emmeans, com ajuste de Tukey para múltiplas comparações. Por fim, para testar se aocorrência de double check dentro da estratégia "Go Last" estava associada a um conflito entre o lado ofertado e o lado previamente visitado pela formiga, foi realizado um teste de proporções (prop.test) comparando a frequência de double check entre ensaios em que a oferta coincidia ou não com o lado esperado.

Resultados e Discussões

Ao decorrer do experimento observamos que algumas formigas checavam a outra extremidade do labirinto após a primeira decisão antes de retornar ao ninho. Partindo desse ponto, foi analisado se as formigas que faziam Double Check tinham mais acertos ao longo dos ensaios, e de acordo com a nossa análise foi visto que: O Double Check aumentava a probabilidade de que a próxima escolha da formiga fosse equivocadaem

relação às que não faziam (figura 2). Em seguida analisamos se esse comportamento tinha ligação com alguma das duas heurísticas (Go Last e Go Different), e obtivemos que em 67.6% das vezes o "Go last" levava a formiga a fazer Double check no ensaio (figura 3).

O fenômeno conhecido como "site fidelity" refere-se à tendência de formigas forrageadoras bem sucedidas retornarem exatamente ao ponto ou às imediações - onde localizaram recursos alimentares (Traniello, 1989). Isso nos permite entender uma possível explicação do porque o "Double Check" aparece com maior frequência após o "Go last"; tendo em vista que ao verificar os dois braços do labirinto a formiga pode apresentar a tendência de voltar onde ela encontrou a última oferta ainda que este lado não fosse o da primeira escolha anterior. Mas se pensarmos que para a formiga tem a possibilidade de explorar o outro local, o que passa a ser feito é o processo de encontrar o alimento, ainda que esse seja o caminho mais longo e só depois retornar ao ninho.

Um estudo feito em campo sobre o comportamento de busca por alimento das operárias de *Dinoponera quadriceps*, revela que estes indivíduos possuem flexibilidade cognitiva para absorver modificações espaciais no habitat familiar, utilizando-se de múltiplos estímulos sensoriais para evitar a dispersão para além de seu território de forrageamento usual (Azevedo; Medeiros; Araujo, 2021). No nosso experimento as formigas ficaram restritas a duas decisões pelo formato do labirinto utilizado (figura 1), assim sendo impossibilitadas de mudar a rota para outros ângulos maiores. E apesar das formigas não apresentarem sempre o "Double check" , essa torna-se uma terceira estratégia que influencia não só na próxima decisão mas também no sucesso do forrageio, ainda que não encontre a recompensa de primeira. Para o nosso modelo de experimento alternado de fato os indivíduos tiveram uma queda no desempenho ao demonstrar esse comportamento (figura 2) - no entanto podemos considerar que as formigas que exploraram os dois lados acabaram ganhando uma vantagem em relação aquelas que não fizeram - não por acertar onde estava a recompensa, mas adquirem a informação adicional de que pode haver comida do outro lado. Nesse caso, podemos encarar como uma espécie de "bônus", ao fazer o Double check sempre encontrará a oferta. E isso se alinha a ideia do que chamamos de considerarmos forrageio ótimo (Pyke, 1984).

Mesmo diante de modificações impostas em sua linha habitual de locomoção, as formigas exibem tamanha plasticidade que o tempo médio gasto para contornar os obstáculos físicos não varia significativamente entre as tentativas sucessivas de forrageamento, alcançando alta eficiência através de correções de curso milimétricas (Azevedo; Medeiros; Araujo, 2021). Quando visualizamos esse ponto de vista, percebemos que a formiga não apenas selecionou uma via, mas reajustou sua rota para garantir o acesso ao alimento, independentemente do acerto imediato na configuração do labirinto. Um outro estudo realizado com abelhas demonstrou que elas apresentaram uma adoção de heurística de "ganha-fica/perde-muda" com base nos resultados da recompensa, apontando que embora inicialmente pudessem ter aprendido a tarefa e retido uma "regra relacional", mudaram conforme o treinamento para algo que demandava menos esforço cognitivo (Madboudi, et al. 2020). Esse comportamento é comparável ao que vimos em nossas formigas, tanto para as que faziam "Double check" quanto para as que não faziam, a diferença evidente é que as que realizam essa ação durante o mesmo ensaio, obtiveram sucesso não para o nosso experimento, mas para a sobrevivência dela e da colônia, pois encontraram o alimento independente de errar ou não. O que pode parecer um trajeto mais longo, pode na verdade ser uma forma mais simples do que pensar em qual lado escolher, se é possível olhar os dois. E isso nos mostra que esse achado se alinha aos

comportamentos vistos em campo, e que essa forma alternativa de resolver o labirinto reflete como esses animais podem contornar certas regras com o intuito de encontrar alimento mesmo quando o ambiente é imprevisível, seja no laboratório ou no ambiente natural.

Conclusão

Em suma, podemos concluir que nossos resultados demonstram que a busca e o acúmulo de informação adicional alteram diretamente a tomada de decisão e a precisão de *Dinoponera quadriceps* ao longo dos ensaios, atingindo plenamente o objetivo proposto. Conclui-se também que embora a estratégia de Double Check tenha reduzido os acertos formais na tentativa seguinte fortemente impulsionada pela heurística Go Last, ela desencadeou reavaliações constantes que priorizam a garantia do recurso em vez de um aprendizado estritamente linear. Assim, alinhando-se aos princípios do forrageio ótimo, o estudo evidencia que a plasticidade de reajustar rotas e explorar o ambiente constitui uma solução de baixo custo cognitivo e alta eficiência adaptativa, essencial para assegurar o alimento para a colônia em cenários de imprevisibilidade.

Referências

ARAUJO, A.; RODRIGUES, Z. Foraging behavior of the queenless ant Dinoponera quadriceps Santschi (Hymenoptera: Formicidae). Neotropical Entomology, v. 35, n. 2, p. 159-164, 2006.

AZEVEDO, D. L. O.; MEDEIROS, J. C.; ARAÚJO, A. Flexibility in the integration of environmental information by Dinoponera quadriceps Kempf during foraging. Revista Brasileira de Entomologia, v. 65, n. 4, e20210084, p. 1-7, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2021-0084

AYERS, C.; ARMSWORTH, P.; BROSI, B. Determinism as a statistical metric for ecologically important recurrent behaviors with trapline foraging as a case study. Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 69, p. 1395-1404, 2015. Disponível em:https://doi.org/10.1007/s00265-015-1948-3.

CZACZKES, Tomer J. Advanced cognition in ants. Myrmecological News, v. 32, p. 51-64, 2022.

DENEBOURG, J. L.; GOSS, S. Collective patterns and decision-making. Ethology Ecology & Evolution, v. 1, n. 4, p. 295-311, 1989.

HAMMER, M.; MENZEL, R. Learning and memory in the honeybee. Journal of Neuroscience, v. 15, n. 3, p. 1617-1630, 1995.

HARTIG, F. DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.7, 2024. Disponível em:https://CRAN.R-

project.org/package=DHARMa. Acesso em: 17 jul. 2025. doi:10.32614/CRAN.package.DHARMa.

HARRISON, Jon M.; BREED, Michael D. Temporal learning in the giant tropical ant, Paraponera clavata. Physiological Entomology, v. 12, p. 317-320, 1987.

OBERHAUSER, F. B.; KOCH, A.; DE AGRÒ, M.; REX, K.; CZACZKES, T. J. Ants resort to heuristics when facing relational-learning tasks they cannot solve. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 287, p. 20201262, 2020.

MABOUDI, H.; SOLVI, C.; CHITTAKA, L. Cognitive strategy switching in bumblebees. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 14, p. 137, 2020. Disponível em:https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00137.

MCGILLYCUDDY, M.; WARTON, D. I.; POPOVIC, G.; BOLKER, B. M. Parsimoniously Fitting Large Multivariate Random Effects in glmmTMB. Journal of Statistical Software, v. 112, n. 1, p. 1-19, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.18637/jss.v112.i01. Acesso em: 17 jul. 2025.

MHATRE, Natasha; ROBERT, Daniel. The drivers of heuristic optimization in insect object manufacture and use. Frontiers in Psychology, v. 9, p. 1-15, 2018. Disponível em:https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00119.

PYKE, G. H. Optimal foraging theory – Introduction. In: BREED, M. D.; MOORE, J. (Eds.). Encyclopedia of Animal Behavior. Academic Press, 2010. p. 601–603.

PYKE, Graham H. Optimal foraging theory: a critical review. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 15, p. 523-575, 1984

SOLVI, C.; MABOUDI, H.; CHITTAKA, L. Bumblebees use both heuristics and algorithms in a multi-option foraging task. Behavioral Ecology, v. 29, n. 6, p. 1431-1438, 2018. Disponível em:https://doi.org/10.1093/behcol/esy105.

TRANIELLO, J. F. A. Chemical communication in foraging and recruitment in ants. In: EDWARDS, D. A.; TRANIELLO, J. F. A.; EVANS, R. (Eds.). Signal and Sense: The Evolution of Sensory Systems. Annual Review of Entomology: University of California Press, 1989. p. 263–280.

WILSON, E. O. (1979). The evolution of caste systems in social insects. Proceedings of the American Philosophical Society, 123(4), 204-210.

Anexos

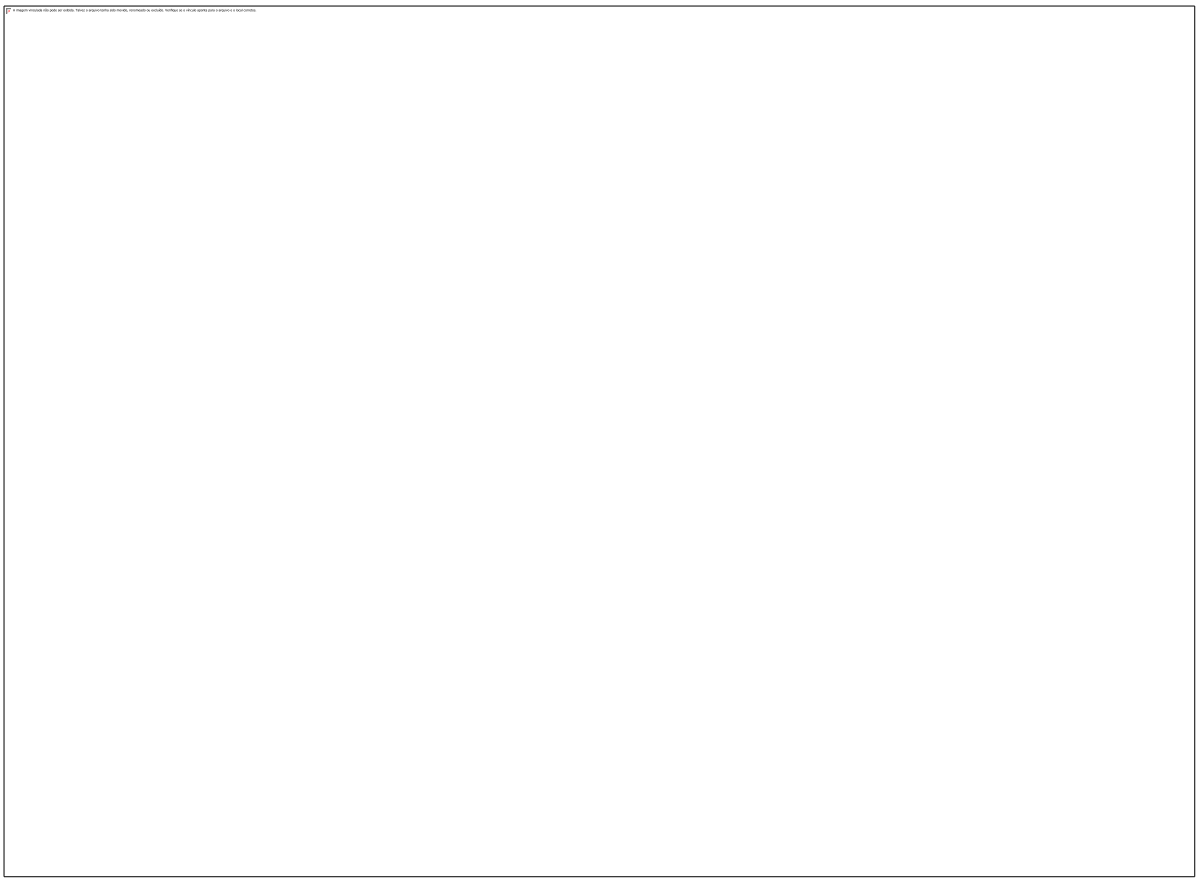


Figura 1. Esquema do modelo de labirinto conectado a arena contendo o ninho utilizado no experimento. Autoria própria, 2025.

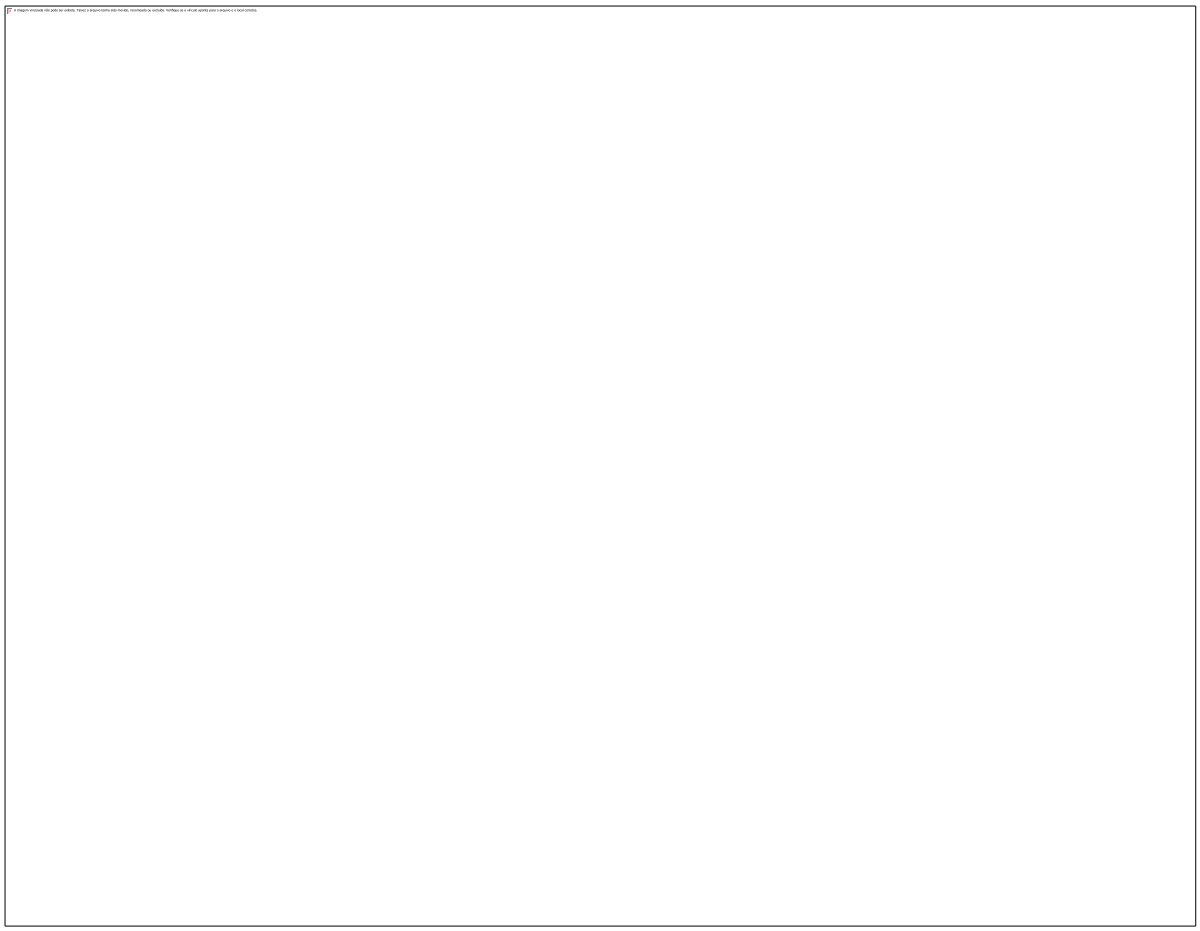


Figura 2. Probabilidade de acerto com e sem Double Check.

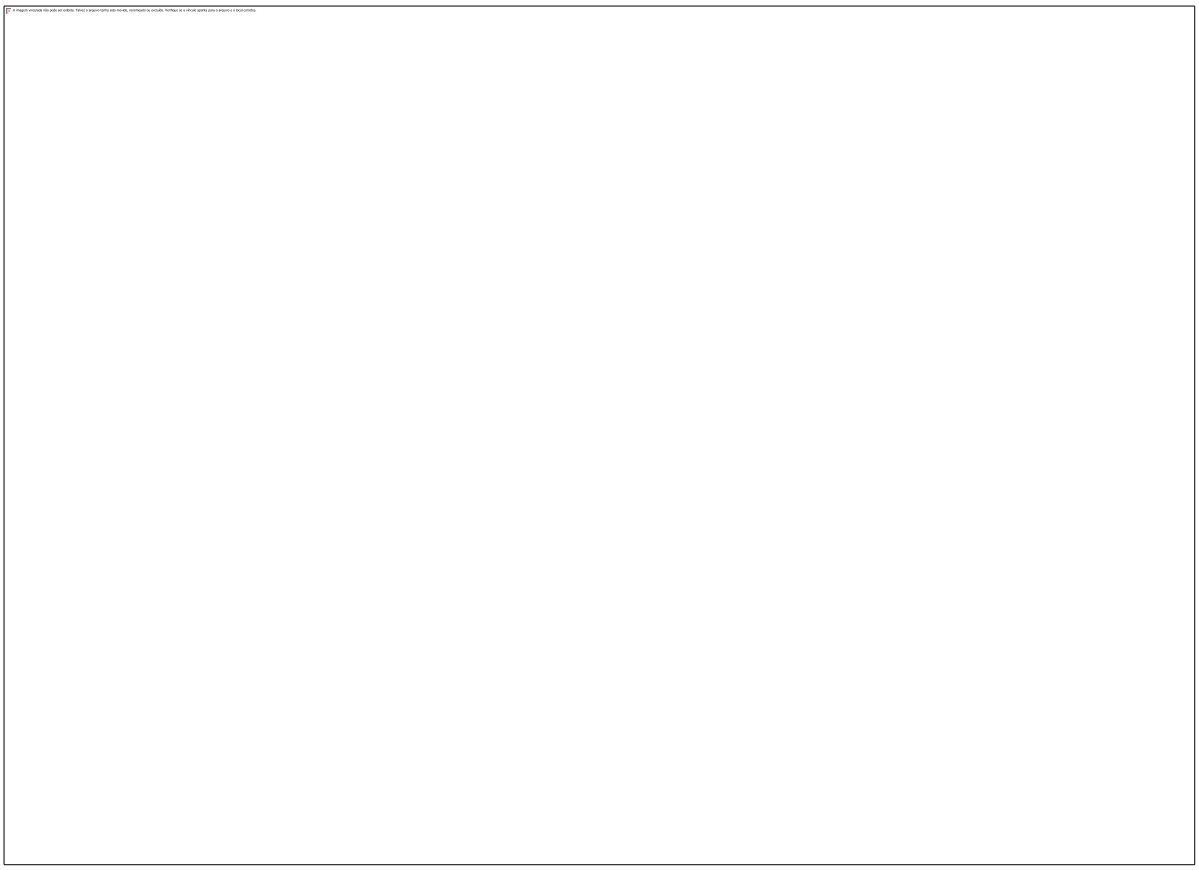


Figura 3. Proporção de Double Check em função de acerto após a heurística Go last.

CÓDIGO: HS0643

AUTOR: LUIZA FRANÇA DE SENA

COAUTOR: SYLVIA GALVÃO DE VASCONCELOS PINHEIRO

COAUTOR: MARIA EDUARDA OLIVEIRA FERNANDES

COAUTOR: RUTE GUEDES MELO

ORIENTADOR: FIVIA DE ARAUJO LOPES

TÍTULO: O Status Socioeconômico Subjetivo e as Decisões de Partilha em Crianças Brasileiras: Um Estudo com Tarefas Virtuais no Contexto da Desigualdade

Resumo

A expressão de comportamentos cooperativos e pró-sociais não decorre exclusivamente de mecanismos biológicos, sendo também fortemente influenciada pela cultura e pelas experiências vivenciadas ao longo do desenvolvimento. Este estudo investigou como o contexto socioeconômico modula a partilha em crianças brasileiras de 6 a 10 anos (M = 8,43; DP = 1,42; n=73. Por meio de uma plataforma virtual (Construct 3), as crianças realizaram tarefas para acumular moedas e participaram de uma versão adaptada do Jogo do Ditador (com dois destinatários: um "host" adulto ou um par anônimo – outra criança) e de uma versão adaptada da escala MacArthur (com 5 casas) para medir o Status Socioeconômico Subjetivo (SSS). Inicialmente, modelos lineares de dados ordinais indicaram que o SSS infantil diminui significativamente com a idade e exibe alta variabilidade no contexto nacional, não estando diretamente associado ao Status Socioeconômico Objetivo (OSS) da família. Ainda, modelagens de efeitos mistos revelaram que o SSS é um preditor robusto das decisões morais: crianças com maior SSS apresentaram menor probabilidade de rejeitar desigualdades auto vantajosas, retendo mais moedas para si no Jogo do Ditador. O OSS apresentou associação marginal, revelando uma forte tendência de crianças de menor renda objetiva rejeitarem a desigualdade favorecida em comparação aos seus pares de maior renda. Os resultados indicam que a percepção subjetiva de rank social, mais do que os recursos materiais familiares

Palavras-chave: Pró-socialidade, status subjetivo, infância, Brasil, desigualdade.

TITLE: Subjective Socioeconomic Status and Sharing Decisions in Brazilian Children: A Study with Virtual Tasks in the Context of Inequality

Abstract

The expression of cooperative and prosocial behaviors does not arise solely from biological mechanisms, but is also strongly influenced by culture and the experiences lived throughout development. This study investigated how the socioeconomic context affects sharing in Brazilian children aged 6 to 10 years (M = 8.43; SD = 1.42; n=73). Using a virtual platform (Construct 3), the children completed tasks to collect coins and participated in an adapted version of the Dictator Game (with two recipients: an adult "host" or an anonymous peer – another child) and an adapted version of the MacArthur ladder (with 5 steps) to measure Subjective Socioeconomic Status (SSS). Initially, ordinal data linear models indicated that children's SSS decreases significantly with age and shows high variability in the national context, not being directly associated with the family's Objective Socioeconomic Status (OSS). Also, mixed-effects modeling. They revealed that SSS is a strong predictor of moral decisions: kids with higher SSS were less likely to reject self-advantageous inequalities, keeping more coins for themselves in the Dictator Game. OSS showed a marginal association, showing a strong trend of lower-income kids rejecting inequality that favored them compared to their higher-income peers. The results suggest that subjective perception of social rank matters more than family material resources.

Keywords: Prosociality, subjective status, childhood, Brazil, inequality.

Introdução

A cooperação e o compartilhamento de recursos desempenham papel central na organização da vida em grupo. Sob uma perspectiva evolucionista, contudo, a emergência e a manutenção de comportamentos cooperativos constituem um desafio teórico, uma vez que a prosocialidade pode implicar custos para o indivíduo que as realiza, ao mesmo tempo em que proporcionam benefícios a terceiros. Diferentes formulações buscaram explicar isso. Entre elas, destaca-se a Teoria da Seleção de Parentesco (Hamilton, 1964), segundo a qual a cooperação entre indivíduos geneticamente relacionados pode favorecer, de forma indireta, a transmissão dos genes compartilhados. A Teoria do Altruísmo Recíproco (Trivers, 1971), por sua vez, propõe que comportamentos cooperativos podem ser favorecidos quando existe a possibilidade de que os benefícios concedidos sejam retribuídos futuramente. Por fim, a Teoria da Reciprocidade Indireta (Alexander, 1985) enfatiza o papel da reputação, sugerindo que agir de maneira altruísta na presença de terceiros pode contribuir para a construção de uma imagem social positiva.

Entretanto, a expressão de comportamentos cooperativos e pró-sociais não decorre exclusivamente de mecanismos biológicos, sendo também fortemente influenciada pela cultura. Conforme proposto por Boyd e Richerson (2005), a adaptação dos grupos humanos está estreitamente relacionada à transmissão, entre gerações, de normas, valores e estratégias comportamentais culturalmente construídas. Nesse contexto, embora as predisposições para a pró-sociabilidade se manifestem precocemente, sua expressão é progressivamente modulada pelas interações. Ainda no primeiro ano de vida, as crianças desenvolvem formas de imitação recíproca que funcionam como importantes recursos de comunicação não verbal (Eckerman & Peterman, 2001). Entre os dois e três anos, tornam-se capazes de participar de interações cooperativas mais

complexas com seus pares. Ao longo da infância, essas competências tornam-se progressivamente mais sofisticadas, e comportamentos como a partilha de recursos passam a ser orientados pela internalização das normas de justiça e reciprocidade.

À medida que amadurecem, as crianças passam a demonstrar maior sensibilidade às normas de equidade, chegando a rejeitar situações de desigualdade auto vantajosa, isto é, aquelas em que recebem mais recursos do que os demais. Nessa etapa do desenvolvimento, tornam-se mais propensas a realizar divisões equitativas. Entretanto, tanto os comportamentos de generosidade quanto às concepções de justiça apresentam importantes variações entre diferentes contextos socioculturais. Entre os fatores que podem contribuir para essas diferenças, destaca-se o status socioeconômico (SES). Embora os estudos que investigam a relação entre o status socioeconômico objetivo (OSS) (estimado a partir de renda e escolaridade) e os comportamentos de partilha apresentem resultados ainda inconsistentes, uma dimensão tem recebido menos atenção: o Status Socioeconômico Subjetivo (SSS), definido como a percepção que o indivíduo possui de sua própria posição relativa na hierarquia social. Em adultos, evidências indicam associações entre essa percepção e diferentes manifestações de pró-sociabilidade; durante a infância, contudo, o papel do SSS nos comportamentos de compartilhamento permanece pouco investigado.

Dessa forma, investigar o papel do SSS na infância permite compreender o mecanismo pelo qual a desigualdade estrutural influencia decisões de partilha. O presente estudo, foca no desenvolvimento do SSS e da pró-socialidade em crianças no Brasil. Nosso país é caracterizado por níveis extremos e históricos de desigualdade socioeconômica. Esse ambiente de acentuada disparidade oferece um cenário único para avaliar como a percepção subjetiva de status social emerge e se relaciona com as decisões distributivas das crianças.

Metodologia

O estudo seguiu uma metodologia quantitativa e experimental baseada em tarefas digitais lúdicas.

Participantes

Participaram 73 crianças com desenvolvimento típico (34 meninas e 39 meninos), com idades compreendidas entre 6 e 10 anos (M = 8,43 anos, DP = 1,42). O recrutamento dos participantes ocorreu por meio de bancos de dados de famílias interessadas em pesquisas científicas de três universidades parceiras, além da utilização do método de amostragem por "bola de neve"(um participante indica outros possíveis participantes) e ampla divulgação em redes sociais (Instagram, Facebook e WhatsApp). A distribuição etária das crianças foi homogênea: 17 de 6 anos, 15 de 7 anos, 14 de 8 anos, 16 de 9 anos e 11 de 10 anos. A caracterização étnica, autorreferida pelos cuidadores seguindo a taxonomia oficial do IBGE, revelou que 47,94% das crianças (n = 35) eram brancas, 39,72% (n = 29) eram pardas (mestiças de ascendência europeia, indígena e africana), 9,51% (n = 6) pertenciam a outras etnias e em 2,72% (n = 2) a etnia não foi declarada. Com relação ao perfil socioeconômico das famílias brasileiras, observou-se uma

concentração de classes médias e altas: 89,04% das famílias (n = 65) possuíam pelo menos um cuidador com ensino superior completo. A classificação socioeconômica segundo o Critério Brasil (ABEP) revelou a seguinte estratificação: Classe A (n = 19; 26,03%), Classe B1 (n = 13; 17,81), Classe B2 (n = 22; 30,14), Classe C1 (n = 5; 6,85), Classe C2 (n = 6; 8,22%), Classes D-E (n = 3; 4,11%) e não declarada (n = 5; 6,85%).

Materiais e Equipamentos

As tarefas experimentais foram programadas na plataforma web de desenvolvimento de jogos virtuais Construct3 (Scirra Ltd., 2021). Os cuidadores completaram questionários sociodemográficos hospedados na plataforma Qualtrics. Para a realização das sessões, as famílias utilizaram seus próprios computadores ou tablets conectados à internet, equipados com câmera e microfone para videoconferência via Zoom ou Google Meet. Ainda, para garantir a inclusão de famílias sem acesso adequado a computadores de alto desempenho ou conexões de rede estáveis, disponibilizou-se uma sala de laboratório equipada na universidade parceira (UFRN), mantendo os mesmos critérios de privacidade e não-observação do ambiente online privado.

Procedimentos e Instrumentos

No momento agendado, as famílias participavam de uma chamada de vídeo com uma experimentadora. Após o consentimento livre e esclarecido dos pais (TCLE) e assentimento verbal das crianças (TALE), a experimentadora guiava a criança em uma fase de tutorial interativo para treinar a mecânica de cliques e arraste de objetos na tela. Concluído o tutorial, a experimentadora desligava temporariamente sua câmera e áudio para garantir privacidade. As tarefas eram conduzidas por instruções gravadas por um "host" virtual.

As tarefas do jogo envolveram:

Tarefas de Aquecimento (Prática): Quatro ensaios de triagem de objetos, nos quais a criança categorizava figuras em círculos correspondentes, e cinco ensaios de julgamento numérico, comparando a quantidade de triângulos em duas caixas. Cada tarefa concluída adicionava uma "moeda digital" a um cofrinho virtual, totalizando moedas que funcionariam como incentivo e recurso real.

Tarefa de Partilha (Jogo do Ditador adaptado): Foram realizados dois ensaios de alocação de recursos. Em cada ensaio, a criança recebia 10 moedas e era informada de que o destinatário não tinha nenhuma. Nos dois ensaios, de forma contrabalançada, os destinatários eram o “host” virtual adulto (visível na tela) ou um par infantil anônimo (uma criança real descrita como necessitada). As crianças decidiam quantas moedas doar e quantas guardar para si no cofrinho, movendo as moedas livremente antes de finalizar a escolha.

Tarefa de Status Socioeconômico Subjetivo (Escala MacArthur Adaptada): Apresentou-se uma escala pictográfica com 5 casas de tamanhos progressivos e quantidade variável de bens. O “host” virtual explicava que as casas representavam a sociedade, desde pessoas vivendo em casas muito pequenas e com poucas coisas (casa 1) até pessoas vivendo em casas enormes e com muitos recursos (casa 5), perguntando em qual delas a criança considerava que morava na vida real.

Lojinha e Encerramento: Ao final, a criança usava suas moedas para "comprar" um livro infantil (físico ou digital, enviado posteriormente). Os pais retornavam à chamada de vídeo, respondiam a um formulário sobre o nível de auxílio prestado (escala de 0 a 5) e a sessão era concluída.

Tradução, Adaptação Cultural e Cuidados Éticos

O protocolo passou por um rigoroso processo de tradução e retrotradução para o português brasileiro por tradutores independentes, seguindo as diretrizes de adaptação transcultural de instrumentos (Borsa et al., 2012). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PVA22866-2024).

Resultados e Discussões

Os dados foram analisados no ambiente R (Versão 2024.04.02), com o nível de significância estabelecido em (p = 0,05). Realizamos dois conjuntos de análises: 1) de investigação dos preditores do Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) infantil; e 2) para examinar se e como a percepção subjetiva de rank social prediz o comportamento de rejeição à desigualdade auto vantajosa.

1) Fatores Associados ao Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) Infantil

Devido à forte concentração de respostas na categoria 4 da escala MacArthur adaptada (casa 4, indicando um provável viés de desejabilidade social ou autorrepresentação em valores moderados), gerando baixa frequência de observações nas categorias inferiores, reorganizamos as respostas em três níveis conceituais estáveis: SSS Baixo (casas 1 a 3), SSS Médio (casa 4) e SSS Alto (casa 5).

Dentre os modelos que nos propusemos a testar, no modelo vencedor incluímos: modelo base predizendo o SSS a partir da idade centrada e percentil de renda relativa (OSS) como efeitos principais fixos e o país como preditor de (este modelo demonstrou o melhor ajuste global e parcimônia).

As estimativas obtidas para o modelo focando na realidade brasileira evidenciam:

A idade revelou-se um preditor significativo e negativo sobre o SSS. Cada ano adicional de desenvolvimento da criança diminui de forma acentuada as chances de que ela selecione uma categoria de status subjetivo superior (OR = 0,626; IC 95% [0,453; 0,864]; z = -2,851; p = 0,004)

A renda familiar relativa (Status Social Objetivo – OSS), não exibiu qualquer associação independente ou efeito direto com as respostas de SSS dadas pelas crianças brasileiras (OR = 0,992; IC 95% [0,793; 1,242]; z = -0,069; p = 0,936.

O parâmetro de escala indicou que a variabilidade nas respostas de status subjetivo no Brasil é significativamente superior à observada na amostra canadense utilizada como

controle transcultural no estudo original (beta = -0,571; IC 95% [-1,139; -0,051]; z = -2,079; p = 0,038). Isso comprova que o julgamento sobre a própria posição social é estatisticamente mais disperso e flutuante entre as crianças brasileiras, comparadas à uma amostra internacional (projeto guarda-chuva).

Tais resultados corroboram importantes pressupostos teóricos da psicologia cognitiva. O declínio acentuado das estimativas de SSS à medida que as crianças brasileiras envelhecem reflete um processo de calibração social. Na infância inicial, as crianças frequentemente operam sob um viés cognitivo otimista ("óculos cor-de-rosa", Boseovski, 2010), avaliando seus lares e recursos de forma inflada. Com o avanço da idade (8 a 10 anos), o amadurecimento cognitivo e a comparação social escolar permitem que as crianças façam inferências realistas, integrando melhor os marcadores externos de estratificação social e resultando em avaliações de status mais modestas.

O fato de a renda familiar real (OSS) não predizer o status subjetivo (SSS) é teoricamente seminal: ele demonstra que as crianças brasileiras não possuem consciência direta ou contábil da renda de seus pais. Em vez disso, constroem seu senso de status a partir de pistas relacionais locais (posse de brinquedos, eletrônicos, vestuário e moradia) em comparação com seus pares diretos. A maior variabilidade nas avaliações das crianças brasileiras encontra correspondência direta na realidade socioeconômica do Brasil. O país é marcado por uma das maiores desigualdades estruturais do planeta (Gini Index, Reis, 2011), onde a segregação geográfica e a disparidade de recursos são onipresentes e altamente visíveis. Essa paisagem urbana fraturada gera referências de comparação intensamente heterogêneas para as crianças, induzindo julgamentos subjetivos marcadamente polarizados.

2) O Papel do SSS na Rejeição da Desigualdade Auto vantajosa

Nos propusemos a investigar se o SSS e a renda familiar objetiva (OSS) guiam o comportamento distributivo de crianças brasileiras frente a um cenário de desigualdade que as favorece. A variável dependente foi a Rejeição de Vantagem, codificada binariamente: 1 se a criança decidiu partilhar de maneira equitativa (doando 5 ou mais de suas 10 moedas ao destinatário); 0 se escolheu manter-se favorecida na distribuição (retendo 6 ou mais moedas, doando apenas de 0 a 4 moedas). Utilizamos Modelos Lineares Mistos Generalizados (GLMMs) com distribuição binomial e função de ligação logit, incluindo efeitos aleatórios para participante (ID).

Nossos principais achados foram:

O status subjetivo exerceu um impacto significativo e negativo sobre a decisão ética de partilha (OR = 0,158; IC 95% [0,030; 0,847]; z = -2,154; p = 0,031). Crianças brasileiras que se percebiam em posições hierárquicas mais elevadas apresentaram chances reduzidas de rejeitarem a desigualdade favorável, tendendo a reter mais moedas para si no Jogo do Ditador.

O status objetivo familiar (OSS) apresentou uma associação marginal e inversa de grande relevância no modelo global (OR = 0,275; IC 95% [0,074; 1,021]; z = -1,928; p = 0,053). Em virtude da significativa interação de país e renda (OR = 5,464; IC 95% [0,852; 35,023]; z = 1,791; p = 0,073), observamos que, no Brasil, as crianças provenientes de famílias de menor renda objetiva foram significativamente mais

propensas a rejeitar a vantagem auto beneficiária e a promover a partilha equitativa do que seus pares brasileiros de renda mais elevada.

Essas modelagens encontram suporte empírico na distribuição descritiva das escolhas distributivas das crianças brasileiras. Verificamos que nos 146 ensaios realizados pelo grupo brasileiro, a escolha modal absoluta foi a divisão perfeitamente equitativa, com 56 ocorrências de doação de 5 moedas. Registramos 30 ocorrências de doação nula (0 moedas), 25 de doação de 1 moeda, 13 de doação de 2 moedas, 5 de doação de 3 moedas, 13 de doação de 4 moedas, e apenas 4 ocorrências de hiper generosidade (1 doação de 7 moedas, 1 de 9 moedas e 2 de 10 moedas). As crianças brasileiras decidiram rejeitar a vantagem auto vantajosa em 86 ensaios e aceitaram a vantagem em 60 ensaios, evidenciando uma preferência majoritária por normas de justiça e igualitarismo.

A descoberta de que o SSS elevado prediz menor rejeição de vantagem nas crianças brasileiras acrescenta uma contribuição teórica crucial à literatura do desenvolvimento moral. Ela revela que o comportamento pró-social não é balizado apenas pela avaliação das circunstâncias alheias (como a vulnerabilidade do receptor), mas principalmente pela representação mental que o próprio agente constrói sobre sua posição na escala social. Um SSS elevado parece ativar precocemente esquemas cognitivos de privilégio subjetivo e merecimento desproporcional, aumentando a retenção do recurso e reduzindo a aversão à desigualdade diante de desfechos assimétricos. Por outro lado, a propensão de crianças de menor status subjetivo (SSS) e menor renda objetiva (OSS) no Brasil a compartilharem de maneira mais equitativa reflete um mecanismo de socialização altamente adaptativo. Em ambientes de elevada instabilidade econômica e escassez estrutural, típicos de segmentos mais vulneráveis no Brasil, a socialização familiar e comunitária enfatiza a interdependência, a reciprocidade e o apoio mútuo como estratégias adaptativas vitais para mitigar riscos. Essas crianças internalizam que a equidade na distribuição é uma salvaguarda para a coesão do grupo, em total consonância com as predições da Teoria da Evolução Cultural de Boyd e Richerson (2005).

As limitações centrais referem-se ao viés de classe média-alta na amostra coletada (89% de pais com ensino superior), decorrente da amostragem virtual. Recomenda-se que pesquisas futuras no Brasil utilizem a metodologia adaptada em escolas públicas de diferentes regiões brasileiras, expandindo a variabilidade social e promovendo o desenvolvimento de intervenções educativas voltadas para a justiça distributiva e a equidade.

Conclusão

Nosso estudo avança na compreensão de como a percepção subjetiva de classe modula o comportamento distributivo de crianças brasileiras de 6 a 10 anos.

As conclusões indicam que:

O SSS é um constructo cognitivo e desenvolvimental ativo na infância média que decresce significativamente com a idade, refletindo um processo de calibração social progressivo das crianças, dissociando-se da métrica de renda objetiva familiar (OSS);

O SSS é o principal preditor do comportamento distributivo no Jogo do Ditador: crianças brasileiras com maior autopercepção de status social apresentam menor probabilidade de rejeitar desigualdades que as beneficiam, revelando sentimentos implícitos de merecimento pessoal;

No Brasil, observa-se uma importante tendência de crianças provenientes de menor renda objetiva familiar (OSS) serem significativamente mais igualitárias e propensas a rejeitar a desigualdade auto vantajosa do que seus pares de maior renda, evidenciando o impacto de estratégias adaptativas de comunalidade comuns em contextos altamente desiguais no país.

Referências

Alexander, R. D. (1985). A biological interpretation of moral systems. Zygon, 20(1), 3-20. https://doi.org/10.1111/j.1467-9744.1985.tb00574.x55

Borsa, J. C., Damásio, B. F., & Bandeira, D. R. (2012). Cross-cultural adaptation and validation of psychological instruments: Some considerations. Paidéia, 22(53), 423-432. https://doi.org/10.1590/1982-4327225320131458

Boseovski, J. J. (2010). Evidence for "rose-colored glasses": An examination of the positivity bias in young children's personality judgments. Child Development Perspectives, 4(3), 212-218. https://doi.org/10.1111/j.1750-8606.2010.00149.x58

Boyd, R., & Richerson, P. J. (2005). The origin and evolution of cultures. Oxford University Press.58

Eckerman, C. O., & Peterman, K. (n.d.). Peers and Infant Social/Communicative Development. Blackwell Handbook of Infant Development, 326-350. doi:10.1002/9780470996348.ch12

Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behavior. I. Journal of Theoretical Biology, 7(1), 1-16. https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90038-463

Reis, E. P. (2011). Elite perceptions of poverty and inequality in Brazil. In M. Blofield (Ed.), The great gap: Inequality and the politics of redistribution in Latin America (pp. 89-108). Pennsylvania State University Press. https://doi.org/10.5325/j.ctv14gp9cw69

Trivers, R. L. (1971). The evolution of reciprocal altruism. The Quarterly Review of Biology, 46(1), 35-57. https://doi.org/10.1086/40675570

World Bank. (2024). Gini Index. World Bank Poverty and Inequality Platform (open data). https://data.worldbank.org/indicator/SI.POV.GINI

CÓDIGO: HS0650

AUTOR: BRUNA EVELLYN FERREIRA DOS SANTOS

COAUTOR: ELIAS DOS SANTOS BATISTA

ORIENTADOR: JOHN FONTENELE ARAUJO

TÍTULO: Cérebro, Coração e Movimento: Como a Pressão do Ritmo Afeta o Desempenho Motor.

Resumo

O estudo investiga como mudanças de cadência no exercício cíclico alteram o desempenho motor (RPM), a modulação autonômica cardíaca (VFC) e a atividade cortical (EEG) em jovens adultos, considerando o nível de atividade física. A amostra de 19 adultos (18 a 40 anos) foi analisada de forma geral e dividida em grupos de menor e maior atividade. Os participantes realizaram um protocolo de 120 segundos em cicloergômetro em duas zonas alvo: 40-50 RPM e 70-80 RPM (ordem aleatorizada), monitorando-se o desempenho motor, VFC (pNN50, RMSSD) e EEG (Entropia Amostral). Os dados foram processados em Python, aplicando-se testes estatísticos para comparações intraindividuais, intergrupais e correlações. Os resultados demonstraram que o aumento da cadência comprometeu acentuadamente o desempenho motor, com o tempo no alvo caindo de 88% para 37%. Simultaneamente, houve aumento seletivo da modulação parassimpática (pNN50) e associações individuais entre respostas corticais e autonômicas, especialmente no grupo de maior atividade física. Isso indica que a elevação da velocidade impôs um desafio predominantemente motor com respostas fisiológicas específicas. Conclui-se que pedalar mais rápido exige ajustes integrados além da força muscular, com sincronia cortical e autonômica que varia entre os indivíduos, revelando que análises focadas apenas em médias grupais podem ocultar essa variabilidade.

Palavras-chave: VFC; EEG; Sistema Nervoso Autônomo; Nível de Atividade Física.

TITLE: Brain, Heart, and Movement: How Rhythmic Pressure Affects Motor Performance.

Abstract

The study investigates how changes in cadence during cyclic exercise alter motor performance (RPM), cardiac autonomic modulation (HRV), and cortical activity (EEG) in young adults, considering their physical activity level. The sample of 19 adults (aged 18 to 40 years) was analyzed overall and divided into lower and higher activity groups. Participants performed a 120-second protocol on a cycle ergometer at two target zones: 40-50 RPM and 70-80 RPM (in randomized order), while motor performance, HRV (pNN50, RMSSD), and EEG (Sample Entropy) were monitored. Data were processed in Python, applying statistical tests for intra-individual and intergroup comparisons, as well as correlations. The results showed that the increase in cadence markedly compromised motor performance, with the time within the target dropping from 88% to 37%. Simultaneously, there was a selective increase in parasympathetic modulation (pNN50) and individual associations between cortical and autonomic responses, especially in the higher physical activity group. This indicates that the increase in speed imposed a predominantly motor challenge with specific physiological responses. It is concluded that pedaling faster requires integrated adjustments beyond muscle strength, with cortical and autonomic synchrony that varies among individuals, revealing that analyses focused solely on group means may obscure this variability.

Keywords: HRV; EEG; Autonomic Nervous System; Physical Activity Level.

Introdução

A execução e a manutenção de uma tarefa motora em cicloergômetro, como a estabilização da cadência de pedaladas em uma faixa específica de rotações por minuto (RPM), exigem a capacidade de produzir, monitorar e ajustar continuamente o movimento. Esse processo envolve um controle motor preciso mediado pela integração de informações sensoriais provenientes do ambiente e do próprio corpo. A cadência constitui um importante componente da dinâmica do ciclismo e pode influenciar aspectos neuromusculares e as demandas impostas durante o exercício (Mater, Clos & Lepers, 2021).

Para atingir e sustentar uma zona-alvo de RPM, o indivíduo precisa integrar informações provenientes do ambiente e do próprio corpo, utilizando especialmente o feedback visual e proprioceptivo para identificar desvios e realizar ajustes no padrão motor (Kasuga et al., 2022). Além disso, a correção contínua do movimento depende do processamento de informações sensoriais e da adaptação dos comandos motores diante de erros e mudanças nas exigências da tarefa (Shadmehr, Smith & Krakauer, 2010). Dessa forma, a estabilização da cadência não envolve apenas a execução mecânica do

movimento, mas também processos contínuos de monitoramento, correção e controle motor.

A realização desses ajustes depende da atuação integrada de mecanismos do Sistema Nervoso Central, relacionados ao controle cognitivo, às funções executivas e à tomada de decisão. O córtex pré-frontal desempenha papel fundamental na regulação do comportamento direcionado a objetivos, participando do monitoramento de informações e da adaptação das respostas diante das demandas da tarefa (Friedman & Robbins, 2022), atuando na construção de decisões rápidas e adaptativas frente a novos desafios motores (Dixon & Dweck, 2022)." Além disso, mecanismos neurais envolvidos na tomada de decisão contribuem para a flexibilidade necessária à adaptação do comportamento diante de mudanças nas informações disponíveis. Nesse contexto, a eletroencefalografia (EEG) permite investigar a atividade elétrica cerebral e possíveis modificações na dinâmica cortical durante tarefas que envolvem atenção, monitoramento e controle do movimento.

Paralelamente às demandas motoras e corticais, o exercício desencadeia respostas fisiológicas que exigem ajustes contínuos do sistema cardiovascular. O Sistema Nervoso Autônomo participa da modulação dessas respostas, enquanto a Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) constitui uma ferramenta não invasiva para avaliar as variações entre os intervalos dos batimentos cardíacos e aspectos da modulação autonômica. Entre seus índices, destacam-se o SDNN, relacionado à variabilidade global, e o RMSSD, associado principalmente às variações de curto prazo e à modulação parassimpática. A resposta da VFC pode variar de acordo com as características e demandas do exercício, refletindo adaptações fisiológicas diante do esforço (Wong & Figueroa, 2021).

O nível habitual de atividade física também pode influenciar a forma como o organismo responde às demandas do exercício. A prática regular de atividade física está associada a benefícios para diferentes sistemas do organismo (Bull et al., 2020), enquanto a insuficiência de atividade física permanece frequente na população mundial (Strain et al., 2024). Entretanto, ainda são limitadas as evidências sobre o comportamento integrado entre desempenho motor, atividade cortical e modulação autonômica durante tarefas específicas que exigem monitoramento contínuo e estabilização de uma cadência-alvo.

Diante disso, torna-se relevante investigar como as atividades cortical e autonômica se comportam na exigência de uma tarefa motora de estabilização da cadência em cicloergômetro. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar o desempenho na estabilização da cadência, as respostas corticais por meio da EEG e a modulação autonômica por meio da VFC entre indivíduos com diferentes níveis de atividade física.

Metodologia

O presente estudo foi desenvolvido com delineamento experimental, transversal e quantitativo, com medidas repetidas nas diferentes condições de cadência. Participaram 19 voluntários adultos jovens clinicamente saudáveis, recrutados por conveniência. Antes da realização dos procedimentos experimentais, os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos, procedimentos e possíveis riscos inerentes à pesquisa. Após a concordância voluntária, todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo os preceitos éticos. A aptidão e a segurança para a realização de atividade física foram previamente verificadas por meio do Questionário de Prontidão para Atividade Física (PAR-Q) (Warburton et al., 2011).

Para a caracterização do nível de atividade física diária, utilizou-se o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ). A partir das informações obtidas por meio deste instrumento, os participantes foram classificados segundo seu nível de gasto energético em atividades físicas diárias (ATVDD) e distribuídos em dois grupos distintos para as análises comparativas: Grupo Menor Atividade (n=11) e Grupo Maior Atividade (n=8). Essa classificação foi utilizada em segundo momento como variável de agrupamento nas análises comparativas entre os indivíduos ao longo de todo o estudo.

A coleta de dados foi realizada por meio de uma tarefa de controle motor contínuo executada em um cicloergômetro (Bicicleta ergométrica modelo MAX H, número de modelo M-BX-0817-803, fabricante DREAM). O protocolo experimental foi estruturado em duas condições de cadência: 40–50 rotações por minuto (RPM) e 70–80 RPM, ambas com 120 segundos de duração ininterrupta. A ordem de aplicação das condições foi aleatorizada por participante, de modo que cada indivíduo realizou uma sequência diferente. Uma das condições correspondeu à faixa de menor cadência (40–50 RPM), servindo como linha de base dinâmica, enquanto a outra condição consistiu na faixa de maior cadência (70–80 RPM), que elevou substancialmente a exigência motora.

Durante a execução do protocolo, os participantes deveriam ajustar continuamente a velocidade de pedalada de modo a permanecer dentro da faixa de RPM pré-estabelecida para cada condição. O desempenho motor foi registrado continuamente utilizando o software LabChart 7.3.8 e um sistema de biofeedback visual, desenvolvido pela equipe de pesquisa, que fornecia informação gráfica em tempo real acerca da cadência executada. Essa

informação visual contínua serviu como referência para que o participante identificasse desvios da zona-alvo e realizasse os ajustes neuromotores necessários para retornar à faixa.

A manipulação experimental central do estudo consistiu na transição abrupta da cadência de 40–50 RPM para 70–80 RPM, permitindo avaliar a capacidade adaptativa do indivíduo frente ao aumento da exigência. O desempenho motor foi quantificado pelo Tempo no Alvo, indicando a porcentagem de tempo que o participante manteve o ritmo imposto. Para uma análise mais profunda do controle motor, avaliou-se também a dinâmica temporal e cinética por meio da Área Sob a Curva (AUC) de Ascensão e de Manutenção/tempo, observando-se não apenas o tempo total, mas o processo sensível de estabilização da cadência. Concomitantemente, a atividade cortical foi registrada via eletroencefalografia (EEG), utilizando a Entropia Amostral (SampEn) nas regiões frontal e parietal para medir a complexidade e a regularidade do sinal, verificando a organização das redes neurais diante da maior exigência motora.

Todo o processamento e a análise estatística foram conduzidos em linguagem Python, via Google Colab, com o uso de bibliotecas como pandas, numpy, scipy, matplotlib e seaborn. O roteiro estatístico avaliou variáveis motoras, cinéticas, autonômicas (VFC) e corticais (EEG). A normalidade dos dados foi atestada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para isolar a variabilidade individual e medir o efeito puro da mudança de cadência, as comparações intraindividuais utilizaram o teste t de Student pareado (dados paramétricos) ou de Wilcoxon (não paramétricos), sempre acompanhados do cálculo de tamanho de efeito.

Para as comparações independentes entre os grupos de Maior e Menor Atividade, aplicou-se o teste t de Welch (garantindo robustez contra variâncias desiguais em amostras assimétricas) ou o teste U de Mann-Whitney. Por fim, a integração sistêmica foi analisada pelo cálculo do delta de variação (diferença entre a maior e a menor cadência) para mensurar a adaptação fisiológica pura. Esses deltas foram correlacionados pelo coeficiente de Spearman, um método robusto contra outliers, verificando se alterações em um domínio associavam-se a modulações sistêmicas coordenadas nos demais parâmetros, adotando-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) para todas as etapas.

Resultados e Discussões

A amostra do estudo foi composta por 19 participantes, cujas características antropométricas, idade e variáveis hemodinâmicas de repouso estão sumarizadas na Tabela 1. Os indivíduos apresentaram idade média de 23,7 ± 6,1 anos, peso corporal de 67,7 ± 17,8 kg e estatura de 166,5 ± 9,8 cm. Os

parâmetros hemodinâmicos basais indicaram que os sujeitos entraram no protocolo em condições normais de repouso, com pressão arterial sistólica de 111,3 ± 10,1 mmHg, diastólica de 70,8 ± 8,8 mmHg e frequência cardíaca de 76,2 ± 10,6 batimentos por minuto (BPM). O estabelecimento desse perfil basal garante a segurança da execução do protocolo e contextualiza a amostra. Após essa avaliação inicial, a análise dos dados experimentais demonstrou que o aumento da cadência de 40–50 RPM para 70–80 RPM produziu respostas distintas nos domínios motor, cortical e autonômico. A análise dos dados demonstrou que o aumento da cadência de 40–50 RPM para 70–80 RPM produziu respostas distintas nos domínios motor, cortical e autonômico.

De modo geral, observou-se redução acentuada da estabilidade da execução motora, acompanhada por alterações nas variáveis cinéticas, enquanto as medidas de complexidade cortical não apresentaram diferenças significativas na amostra total. No domínio autonômico, o pNN50 aumentou significativamente, ao passo que o lnRMSSD permaneceu estável. Além disso, a análise das variações individuais entre as condições identificou associações entre medidas corticais e autonômicas, especialmente entre os participantes do grupo de maior atividade física. Esses resultados são apresentados e discutidos a seguir em três figuras principais. A tabela 2 apresenta o comportamento das variáveis relacionadas ao desempenho motor e à dinâmica da execução da tarefa nas duas condições experimentais. Na amostra total (N = 19), o Tempo no Alvo reduziu de 88,42 ± 10,47%, em 40–50 RPM, para 37,40 ± 17,99%, em 70–80 RPM. Essa redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) e apresentou tamanho de efeito muito grande ($d = -2,541$).

Esse resultado demonstra que a elevação da cadência comprometeu de forma acentuada a capacidade dos participantes de permanecer dentro da faixa de RPM estabelecida. Em termos práticos, como observado na Figura 2, enquanto na condição de menor cadência os participantes permaneceram dentro da zona-alvo durante a maior parte do período analisado, na condição de maior cadência essa capacidade foi reduzida de maneira substancial. Assim, o aumento da exigência motora representou um desafio efetivo para a manutenção do ritmo.

Esse comportamento é compatível com a literatura que demonstra que alterações na cadência de pedalada modificam as demandas neuromusculares e biomecânicas da tarefa. Mater, Clos e Lepers (2021), em revisão sistemática, identificaram que a cadência influencia a função neuromuscular e que aumentos na velocidade de pedalada podem modificar o padrão de recrutamento muscular e as exigências impostas ao sistema locomotor. Nesse contexto, a dificuldade observada no presente estudo provavelmente não representa apenas uma dificuldade de “pedalar mais rápido”, mas uma maior necessidade de reorganização e controle do movimento para acompanhar a nova condição.

Segundo Gronwald et al. (2020), o exercício exige ajustes coordenados entre os sistemas central e autonômico. No presente estudo, os indivíduos mais ativos apresentaram maior regularização da atividade frontal e preservação ou aumento da modulação vagal na condição de maior exigência (70–80 RPM). Esse padrão é compatível com Li e Smith (2021), que identificaram evidências de maior eficiência neural associada ao treinamento físico. Assim, a integração observada no grupo mais ativo pode refletir maior capacidade de adaptação às demandas motoras e cognitivas simultâneas.

A natureza da tarefa também deve ser considerada. Os participantes não simplesmente executavam pedaladas em velocidade livre; eles precisavam atingir uma faixa específica de RPM e utilizar o feedback visual para monitorar continuamente seu desempenho. Dessa forma, o aumento da cadência exigiu simultaneamente maior frequência de movimento e correções sucessivas dos desvios em relação à meta. Essa característica é coerente com os princípios do controle motor, segundo os quais a execução e a adaptação do movimento dependem da integração contínua entre comandos motores e informações sensoriais, permitindo a detecção de erros e a realização de ajustes necessários ao desempenho. Dessa forma, modificações nas exigências da tarefa podem aumentar a necessidade de monitoramento e de correções sucessivas da resposta motora (Shadmehr, Smith & Krakauer, 2010). As alterações também foram observadas nas variáveis cinéticas. A AUC de Ascensão aumentou de 158,31 ± 46,97 para 227,03 ± 64,80, com $p = 0,001$ e tamanho de efeito grande ($d = 0,883$). Paralelamente, a AUC de Manutenção/tempo reduziu de 85,35 ± 22,53 para 68,29 ± 27,78, com $p = 0,037$ e tamanho de efeito médio ($d = -0,518$). O aumento da AUC de Ascensão associado à redução da AUC de Manutenção/tempo sugere que a mudança para a maior cadência alterou não somente o desempenho final, mas também a dinâmica temporal da resposta. Houve maior demanda durante o processo de ascensão, mas menor capacidade de manutenção da resposta ao longo da condição de maior exigência. Dessa maneira, os resultados indicam uma transição para um estado motor menos estável quando a tarefa passou para 70–80 RPM. A análise estratificada mostrou que esse efeito esteve presente em ambos os grupos. Entre os participantes do Grupo Maior Atividade ($n = 8$), o Tempo no Alvo reduziu de 85,59 ± 13,76% para 41,55 ± 20,32% ($p = 0,002$), enquanto a AUC de Ascensão aumentou de 147,10 ± 35,27 para 200,76 ± 51,52 ($p = 0,016$). A AUC de Manutenção/tempo diminuiu de 81,75 ± 25,92 para 54,35 ± 28,29, atingindo $p = 0,050$ e demonstrando um tamanho de efeito considerável ($d = -0,836$). No Grupo Menor Atividade ($n = 11$), o Tempo no Alvo reduziu de 90,48 ± 7,34% para 34,39 ± 16,43% ($p < 0,001$) e a AUC de Ascensão aumentou de 166,45 ± 54,09 para 246,14 ± 68,90 ($p = 0,019$).

Portanto, independentemente do grupo, a transição para a cadência elevada produziu um padrão semelhante: menor capacidade de permanecer na zona-

alvo e maior alteração na dinâmica de ascensão. Esse achado fortalece a interpretação de que a manipulação da cadência foi o principal fator associado à mudança no desempenho. Entretanto, a comparação direta entre os grupos não demonstrou diferenças estatisticamente significativas no Tempo no Alvo ou nas variáveis cinéticas. Em 40–50 RPM, o Tempo no Alvo apresentou $p = 0,545$, enquanto em 70–80 RPM apresentou $p = 0,427$. Também não houve diferenças significativas entre os grupos para as variáveis cinéticas nas condições avaliadas.

Assim, apesar de algumas diferenças numéricas entre os grupos, não há evidência estatística de que o nível de atividade física, conforme definido neste estudo, tenha determinado um melhor desempenho motor. O resultado mais consistente foi o efeito da própria elevação da cadência sobre a tarefa. Esse achado é importante para a interpretação do estudo, pois demonstra que a maior demanda motora foi capaz de comprometer a estabilidade do movimento tanto em indivíduos do grupo de maior quanto de menor atividade. Ainda na Tabela 2 observam-se os resultados referentes à Entropia Amostral (SampEn) nas regiões frontal e parietal. Essa medida quantifica propriedades de regularidade e complexidade temporal do sinal. Portanto, alterações na SampEn representam modificações na dinâmica do sinal cortical, mas não devem ser interpretadas diretamente como aumento ou redução de "ativação cerebral". Na amostra total, a SampEn Frontal apresentou redução de $1,98 \pm 0,40$ para $1,78 \pm 0,39$, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,178$; $d = -0,321$). A SampEn Parietal também apresentou redução numérica, de $1,59 \pm 0,59$ para $1,44 \pm 0,46$, mas sem significância estatística ($p = 0,383$; $d = -0,205$).Esses resultados indicam que embora os valores médios tenham apresentado tendência de redução, não foi demonstrada uma alteração sistemática da complexidade cortical na amostra como um todo diante do aumento da cadência. Esse achado contrasta com a grande alteração observada no comportamento motor, sugerindo que a dificuldade de manutenção da RPM não esteve necessariamente acompanhada por uma mudança equivalente na complexidade global do sinal cortical avaliado.

A análise deve ser compreendida à luz da organização distribuída do controle motor. Movimentos cíclicos, como o ciclismo, envolvem interação entre redes motoras, sensoriais e cognitivas, e não dependem exclusivamente de uma única região cerebral. Storzer et al. (2017) demonstraram que a execução de ciclismo está associada a oscilações neurais relacionadas à organização temporal do movimento. Dessa forma, a estabilidade da SampEn observada na amostra global não significa ausência de participação cortical, mas indica que as medidas de complexidade utilizadas não detectaram uma mudança ampla e consistente nas regiões estudadas.Na análise estratificada, surgiu uma alteração específica no Grupo Menor Atividade. Nesse grupo, a SampEn Frontal reduziu de $1,99 \pm 0,46$ para $1,67 \pm 0,23$, com $p = 0,050$ e $d = -0,671$. Como o critério

estabelecido para significância foi $p < 0,05$, esse resultado deve ser descrito como uma alteração limítrofe, e não como uma diferença estatisticamente comprovada.

A redução da SampEn Frontal pode representar uma mudança para uma dinâmica cortical mais regular durante a condição de maior exigência. Uma possibilidade é que a tarefa tenha aumentado a necessidade de monitoramento e controle do movimento, especialmente entre os participantes que apresentaram menor nível de atividade. Entretanto, essa interpretação deve permanecer como hipótese, pois a redução da entropia não demonstra, isoladamente, maior ativação do córtex pré-frontal ou maior foco atencional. A literatura sobre controle cognitivo fornece suporte para a possibilidade de maior envolvimento de mecanismos de controle durante tarefas que exigem monitoramento contínuo. Friedman e Robbins (2022) descrevem o córtex pré-frontal como componente central das funções executivas e do comportamento orientado a objetivos. Da mesma forma, Uddin (2021) destaca que a flexibilidade cognitiva e comportamental depende da interação entre redes cerebrais distribuídas, incluindo regiões frontoparietais e frontoestriatais, permitindo a adaptação das respostas diante de mudanças nas demandas da tarefa. Nesse contexto, a tendência de redução da SampEn Frontal observada no grupo de menor atividade pode ser compatível com uma reorganização da dinâmica cortical diante da maior exigência da tarefa, mas não permite determinar, isoladamente, o mecanismo responsável.

A ausência de alterações significativas na SampEn Parietal e a diferença limítrofe restrita à região frontal também sugerem que as respostas corticais podem ter sido específicas para determinados participantes ou regiões. Assim, os resultados não sustentam a hipótese de uma alteração cortical global provocada pela maior cadência, mas indicam que indivíduos do grupo de menor atividade podem ter apresentado mudanças específicas na dinâmica frontal. Ao observarmos as medidas do sistema autonômico, os resultados da VFC. O lnRMSSD permaneceu praticamente inalterado, passando de $3,80 \pm 0,86$ para $3,81 \pm 0,69$, com $p = 0,958$ e tamanho de efeito trivial ($d = 0,012$). Em contraste, o pNN50 aumentou de $3,70 \pm 3,42\%$ para $7,73 \pm 7,11\%$, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,026$) e tamanho de efeito médio ($d = 0,557$).

O aumento do pNN50 demonstra que a maior cadência esteve associada a uma alteração significativa nesse indicador de VFC. Como o pNN50 está relacionado às variações de curto prazo entre os intervalos cardíacos e à modulação parassimpática, o resultado é compatível com uma alteração da resposta vagal durante a condição de maior exigência. Contudo, a estabilidade do lnRMSSD demonstra que essa alteração não ocorreu de maneira uniforme entre todos os parâmetros autonômicos. Essa diferença entre os indicadores é importante. O pNN50 e o RMSSD avaliam componentes relacionados, porém utilizam propriedades matemáticas diferentes do intervalo entre os batimentos.

Consequentemente, o comportamento divergente encontrado neste estudo não deve ser interpretado como contradição, mas como evidência de que a resposta autonômica pode assumir padrões distintos dependendo do índice utilizado. A análise estratificada reforçou a ausência de uma diferença simples entre os grupos. Embora o pNN50 tenha aumentado nos dois grupos, a comparação direta entre participantes de Maior e Menor Atividade não revelou diferenças estatisticamente significativas entre eles nas condições experimentais. Em 40–50 RPM, os parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas (lnRMSSD: $p = 0,114$); em 70–80 RPM, o lnRMSSD apresentou $p = 0,778$ e outras variáveis também permaneceram acima do limite de significância.Portanto, assim como ocorreu com o desempenho motor, o principal efeito observado foi associado à mudança de cadência, e não a uma diferença estatisticamente comprovada entre os níveis de atividade física.

A Figura 3 exibe as análises de correlação entre os domínios cortical e autonômico por meio das variações individuais (deltas) entre as duas condições. Na amostra total, foi observada uma correlação positiva moderada e estatisticamente significativa entre o ΔlnRMSSD e o ΔSampEn Parietal ($rs = 0,493$; $p = 0,032$). Isso significa que os participantes que apresentaram maior variação do lnRMSSD também tenderam a apresentar maior variação da complexidade cortical parietal. Esse achado sugere que as mudanças autonômicas e corticais estiveram estatisticamente associadas durante a elevação da exigência motora. A literatura oferece suporte para a existência de relações entre atividade autonômica e processos cognitivos. Magnon et al. (2022), em uma revisão sistemática e meta-análise, identificaram uma associação positiva entre a VFC mediada vagalmente e o funcionamento executivo, com relações particularmente evidentes para a flexibilidade e a inibição cognitiva. Embora o contexto desses estudos não seja idêntico ao presente protocolo, esses achados sustentam a possibilidade de interação entre os sistemas autonômico e cognitivo, contribuindo para a interpretação da associação observada entre as alterações na VFC e na atividade cortical.Da mesma maneira, Stuldreher et al. (2020) demonstraram relações entre medidas de EEG e variáveis fisiológicas cardíacas durante processos de atenção seletiva. Apesar de o estudo ter sido conduzido em outro contexto experimental, ele reforça a utilidade de análises simultâneas de sinais centrais e periféricos para investigar respostas fisiológicas integradas.

Conforme apresentado na Figura 4, uma correlação negativa forte foi observada no Grupo Maior Atividade entre o ΔpNN50 e o ΔSampEn Frontal ($rs = -0,762$; $p = 0,028$). Esse coeficiente negativo indica que as duas variáveis alternam em sentidos opostos: maiores aumentos do pNN50 estiveram associados a maiores reduções da SampEn Frontal neste grupo. Esse resultado é particularmente relevante porque a associação não foi observada no grupo de menor atividade. Ele sugere que, nos participantes do grupo de maior atividade, a alteração da

resposta autonômica e a alteração da dinâmica cortical frontal apresentaram maior grau de associação durante a transição para a cadência elevada. Entretanto, esse resultado não deve ser descrito como "controle perfeito" do coração pelo cérebro ou como demonstração de um trade-off causal entre atenção frontal e modulação vagal. O coeficiente de correlação demonstra associação, e não causalidade. Além disso, a SampEn não permite afirmar isoladamente que ocorreu maior ativação ou maior foco pré-frontal. A interpretação mais segura é que indivíduos do grupo de maior atividade apresentaram um padrão inverso de variação entre a complexidade do sinal frontal e o pNN50. Esse resultado pode ser discutido à luz das relações entre a VFC e o controle cognitivo. Magnon et al. (2022) identificaram associações entre a VFC mediada vagalmente e funções executivas, sugerindo uma relação entre a regulação autonômica e processos cognitivos. Paralelamente, Friedman e Robbins (2022) destacam o papel do córtex pré-frontal no controle de comportamentos orientados a objetivos.

A associação observada exclusivamente no grupo com maior nível de atividade física também pode estar relacionada aos efeitos do exercício sobre a plasticidade cerebral. De Sousa Fernandes et al. (2020) demonstraram que a prática regular de exercício está associada a mecanismos de neuroplasticidade e a benefícios para a função cerebral. Embora o presente estudo não tenha avaliado diretamente esses mecanismos, os resultados são compatíveis com a hipótese de que indivíduos mais ativos apresentem maior capacidade de integrar demandas motoras, cognitivas e autonômicas durante a tarefa. A ausência de correlações significativas no Grupo Menor Atividade também deve ser considerada. Nenhuma associação entre os deltas apresentou $p > 0,05$ como evidência de significância estatística. Esse contraste pode sugerir diferentes padrões de organização da resposta nos grupos, mas não permite afirmar definitivamente que indivíduos mais ativos possuam maior integração cérebro-coração. O tamanho reduzido dos grupos limita a força dessa conclusão e aumenta a possibilidade de influência da variabilidade individual.

Considerando conjuntamente as quatro figuras, o resultado mais robusto do estudo foi o impacto da maior cadência sobre o desempenho motor. A redução do Tempo no Alvo, associada ao aumento da AUC de Ascensão e à redução da AUC de Manutenção/tempo, demonstra que a condição de 70–80 RPM tornou a tarefa substancialmente mais difícil de executar e sustentar. No domínio cortical, não houve alteração significativa da complexidade frontal ou parietal na amostra total. A redução limítrofe da SampEn Frontal observada no grupo de menor atividade constitui um achado relevante, porém deve ser interpretada como uma tendência, e não como evidência definitiva de aumento da demanda cognitiva. O resultado reforça a necessidade de análises mais específicas para compreender quais mecanismos neurais participam da adaptação à tarefa. No domínio autonômico, o pNN50 apresentou aumento significativo, enquanto o

lnRMSSD permaneceu estável. Isso indica uma resposta autonômica seletiva e reforça a importância de analisar mais de um índice de VFC.

As correlações entre os deltas fisiológicos demonstraram que a ausência de diferenças nas médias entre os grupos não indica falta de relação sistêmica. A associação positiva entre ΔlnRMSSD e ΔSampEn Parietal (na amostra total) e a associação negativa entre ΔpNN50 e ΔSampEn Frontal (no grupo de maior atividade) evidenciam que as mudanças nos sistemas autonômico e cortical ocorrem de forma coordenada durante o aumento da exigência motora. Em conjunto, os resultados sugerem que a elevação da cadência impõe um desafio predominantemente motor, acompanhado por respostas autonômicas específicas e por dinâmicas integradas entre cérebro e coração, muitas vezes mascaradas quando se analisa apenas as médias grupais. Isso reforça a importância de uma abordagem simultânea para avaliar o desempenho motor, a atividade cerebral e a regulação autonômica.

LIMITAÇÕES

As correlações indicam que as dinâmicas cardíaca e cortical ocorrem de forma coordenada diante da exigência motora, exigindo análises integradas. A principal limitação foi o uso do questionário subjetivo IPAQ em uma amostra reduzida (N=19), gerando grupos homogeneamente ativos. Logo, a falta de diferenças expressivas entre os grupos reflete um viés de classificação e baixa variabilidade da amostra, não uma incongruência biológica nas respostas fisiológicas.

Conclusão

A conclusão deste estudo evidencia que o aumento da cadência no ciclismo estacionário, com a transição de 40-50 RPM para 70-80 RPM, transcende a simples exigência mecânica, configurando-se como um complexo desafio sistêmico e multidimensional. O achado primário demonstra que a maior demanda motora comprometeu substancialmente o "Tempo no Alvo" em todos os participantes, indicando uma transição imediata para um estado de controle motor menos estável. As alterações na dinâmica temporal, representadas pela maior necessidade de esforço inicial para atingir a meta (aumento significativo da AUC de Ascensão) e pela dificuldade de sustentação da cadência (redução da AUC de Manutenção), reforçam a premissa de que a regulação de movimentos cíclicos sob cadências externamente impostas requer ajustes neuromusculares contínuos e precisos.

No domínio autonômico, observou-se uma modulação vagal seletiva. O

aumento significativo do indicador pNN50, sem alteração correspondente no lnRMSSD, sugere que as adaptações parassimpáticas de curtíssimo prazo são altamente sensíveis à necessidade de reorganização sensório-motora. Essa resposta sistêmica alinha-se aos preceitos do Modelo de Integração Neurovisceral proposto por Thayer et al. (2009), que postula a existência de uma rede interconectada entre o sistema nervoso central (córtex pré-frontal) e a regulação cardíaca periférica. Esse eixo é fundamental para a adaptação fisiológica diante de novas demandas ambientais. Dessa forma, a manutenção do controle autonômico durante o exercício dinâmico não é um evento reativo isolado, mas uma parte estrutural do enfrentamento ao estresse físico.

No âmbito do córtex cerebral, a ausência de mudanças significativas na complexidade global do sinal (SampEn Frontal e Parietal) na amostra total sugere que a estabilização do movimento em cadências mais altas não depende de uma mudança generalizada na dinâmica eletrocortical de superfície, mas possivelmente de refinamentos subcorticais ou de ajustes locais muito específicos. Contudo, a descoberta mais intrigante desta pesquisa reside na análise integrativa das variações individuais (deltas). A forte correlação negativa entre a variação do controle parassimpático (ΔpNN50) e a variação da complexidade cortical frontal (ΔSampEn Frontal), observada exclusivamente no grupo com maior nível de atividade física, ilustra uma sofisticada estratégia de alocação de recursos neurais.

Em suma, conclui-se que a execução de tarefas motoras sob restrição temporal e foco de atenção exige uma complexa integração cérebro-coração. Embora o desempenho final não tenha diferido nas médias entre os grupos de maior e menor atividade física, a arquitetura da resposta fisiológica divergiu radicalmente. Isso evidencia a necessidade de avaliar o desempenho humano sob uma ótica sistêmica, integrando a cinética motora, a complexidade neural e a modulação cardiovascular, abrindo novas perspectivas para o treinamento esportivo e a reabilitação neuromotora.

Referências

[1] BULL, F. C. et al. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. British Journal of Sports Medicine, [S. l.], v. 54, n. 24, p. 1451-1462, 2020. DOI: 10.1136/bjsports-2020-102955.

[2] DE SOUSA FERNANDES, M. S. et al. Effects of physical exercise on neuroplasticity and brain function: a systematic review in human and animal studies. Neural Plasticity, [S. l.], v. 2020, art. 8856621, 2020. DOI: 10.1155/2020/8856621.

[3] DIXON, M. L.; DWECK, C. S. The amygdala and the prefrontal cortex: The co-construction of intelligent decision-making. Psychological Review, [S. l.], v. 129, n. 6, p. 1414, 2022.

[4] FRIEDMAN, N. P.; ROBBINS, T. W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. Neuropsychopharmacology, [S. l.], v. 47, p. 72-89, 2022. DOI: 10.1038/s41386-021-01132-0.

[5] GRONWALD, T. et al. Brain neuro-autonomic regulation during exercise: The role of internal and external load. Frontiers in Physiology, [S. l.], v. 11, p. 569, 2020.

[6] KASUGA, S.; CREVECOEUR, F.; CROSS, K. P.; BALALAIE, P.; SCOTT, S. H. Integration of proprioceptive and visual feedback during online control of reaching. Journal of Neurophysiology, [S. l.], v. 127, n. 2, 2022. DOI: 10.1152/jn.00639.2020.

[7] LI, L.; SMITH, D. M. Neural efficiency in athletes: a systematic review. Frontiers in Behavioral Neuroscience, [S. l.], v. 15, art. 698555, 2021. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.698555.

[8] MAGNON, V. et al. Does heart rate variability predict better executive functioning? A systematic review and meta-analysis. Cortex, [S. l.], v. 155, p. 218-236, 2022. DOI: 10.1016/j.cortex.2022.07.008.

[9] MATER, A.; CLOS, P.; LEPERS, R. Effect of cycling cadence on neuromuscular function: a systematic review of acute and chronic alterations. International Journal of Environmental Research and Public Health, [S. l.], v. 18, n. 15, art. 7912, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18157912.

[10] SHADMEHR, R.; SMITH, M. A.; KRAKAUER, J. W. Error correction, sensory prediction, and adaptation in motor control. Annual Review of Neuroscience, [S. l.], v. 33, p. 89-108, 2010. DOI: 10.1146/annurev-neuro-060909-153135.

[11] STORZER, L. Neural oscillations underlying bicycling and walking. 2016. Tese (Doutorado) – Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 2016.

[12] STRAIN, T. et al. National, regional, and global trends in insufficient physical activity among adults from 2000 to 2022: a pooled analysis of 507 population-based surveys with 5.7 million participants. The Lancet Global Health, [S. l.], v. 12, n. 8, p. e1232-e1243, 2024. DOI: 10.1016/S2214-109X(24)00150-5.

[13] STULDREHER, I. V. et al. Physiological synchrony in EEG, electrodermal activity and heart rate detects attentionally relevant events in time. Frontiers in Neuroscience, [S. l.], v. 14, art. 575521, 2020. DOI: 10.3389/fnins.2020.575521.

[14] THAYER, J. F. et al. Heart rate variability, prefrontal neural function, and cognitive performance: the neurovisceral integration perspective on self-regulation, adaptation, and health. Annals of Behavioral Medicine, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 141-153, 2009.

[15] UDDIN, L. Q. Cognitive and behavioural flexibility: neural mechanisms and clinical considerations. Nature Reviews Neuroscience, [S. l.], v. 22, p. 167–179, 2021. DOI: 10.1038/s41583-021-00428-w.

[16] WARBURTON, D. E. R. et al. The Physical Activity Readiness Questionnaire for Everyone (PAR-Q+) and Electronic Physical Activity Readiness Medical Examination (ePARmed-X+). Health & Fitness Journal of Canada, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 3-17, 2011. DOI: 10.14288/hfjc.v4i2.103.

[17] WONG, A.; FIGUEROA, A. Effects of acute stretching exercise and training on heart rate variability: a review. Journal of Strength and Conditioning Research, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 1459-1466, 2021. DOI: 10.1519/JSC.0000000000003084.

CÓDIGO: HS0657

AUTOR: RICK JOB SANTOS PEREIRA DA SILVA

COAUTOR: IGOR ELOI MOREIRA

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Se sobra satisfação, sobra motivação? A relação entre sistema de opioide endógenos e forrageio em formigas Dinoponera quadriceps

Resumo

Este estudo investigou o papel da sinalização de opioides endógenos no comportamento de exploração em formigas gigantes (*Dinoponera quadriceps*). A exploração, componente do forrageio, é um comportamento motivado regulado por sistemas neurais de satisfação, como o sistema de opioides endógenos (SOE). Embora o SOE seja, supostamente, ausente em invertebrados, estudos anteriores indicaram que a administração do seu agonista, Morfina (MORF), aumenta a exploração. Para testar essa hipótese, 72 operárias forrageadoras de *D. quadriceps* receberam diferentes dosagens de MORF (0,005 g/ml, 0,01 g/ml, 0,02 g/ml), além de grupos controle. Elas foram anestesiadas e a solução administrada intracranialmente. Seus comportamentos foram filmados e analisados. Os resultados mostraram que, enquanto os grupos submetidos à cirurgia e à cirurgia + soro, exibiram maior incidência de limpeza, sugerindo estereotipia por estresse, todas as dosagens de MORF causaram uma diminuição significativa nessa estereotipia e um aumento na locomoção, equiparando-se ao do grupo controle. Essas descobertas corroboram estudos prévios e sugerem que a MORF atuou como um analgésico e motivador para a exploração. Apesar da ausência de receptores exclusivos de SOE em invertebrados, os resultados indicam um efeito da sinalização de opioides endógenos, possivelmente via ligação de neuropeptídeos a receptores em outras vias neurais.

Palavras-chave: Exploração. Ponerinae. Morfina. Neuropeptídeo.

TITLE: IF SATISFACTION IS LEFT OVER, IS MOTIVATION LEFT OVER? THE RELATIONSHIP BETWEEN ENDOGENOUS OPIOID SYSTEM AND FORAGING IN ANTS Dinoponera quadriceps

Abstract

This study investigated the role of endogenous opioid signaling in the exploratory behavior of giant ants (*Dinoponera quadriceps*). Exploration, a component of foraging, is a motivated behavior regulated by neural satisfaction systems, such as the endogenous opioid system (EOS). Although the EOS is supposedly absent in invertebrates, previous studies have indicated that the administration of its agonist, Morphine (MORF), increases exploration. To test this hypothesis, 72 foraging workers of *D. quadriceps* received different dosages of MORF (0.005 g/ml, 0.01 g/ml, 0.02 g/ml), in addition to control groups. They were anesthetized, and the solution was administered intracranially. Their behaviors were filmed and analyzed. The results showed that while the groups subjected to surgery and surgery + saline exhibited a higher incidence of cleaning, suggesting stress-induced stereotypy, all MORF dosages caused a significant decrease in this stereotypy and an increase in locomotion, comparable to the control group. These findings corroborate previous studies and suggest that MORF acted as an analgesic and motivator for exploration. Despite the absence of exclusive EOS receptors in invertebrates, the results indicate an effect of endogenous opioid signaling, possibly via the binding of neuropeptides to receptors in other neural pathways.

Keywords: Exploration. Ponerinae. Morphine. Neuropeptide.

Introdução

Na etologia, entende-se que a exploração é intrínseca ao comportamento de forrageio, pois ela representa a primeira etapa dessa atividade de busca do animal por recursos necessários para a sua sobrevivência, que é dividida em: a procura, a captura e a ingestão/ armazenamento desses recursos (Pyke, 2010). Dessa forma, podemos diferenciar em duas grandes categorias a partir do forrageio: em solitário, quando um sujeito é responsável por exercer as três etapas sozinho, tendo de exemplo as formigas da espécie *Dinoponera quadríceps* (Lanan, 2014); ou em cooperativo, feito por mais de um sujeito, podendo variar a quantidade dessa coletividade entre cada espécie (Traniello, 1989) como visto na formiga *Lasius japonicus* que exerce todos as etapas em coletivo (Yamanaka et al., 2022).

Além disso, a exploração representa um comportamento motivado, por relacionar estímulos internos, como a fome e a sede, a estímulos externos, como a presença de alimento, para instigar a atividade do animal em prol de um objetivo específico (nesse caso, obter recursos) (Simpson et al., 2016). Por conseguinte, esses estímulos necessitam de sistemas neurais de satisfação, como o sistema de opioides endógenos (SOE), para parcialmente, reger seu funcionamento. Isso ocorre através da liberação de neurotransmissores (sinais químicos produzidos por neurônios) nas vias sinápticas, que se acoplam apenas em seus receptores específicos e com essa ligação causam o efeito de reforço positivo (sensação de prazer) ao animal após ele completar sua ação (Nestler et al., 2019). Assim, esse sistema o motiva e mantém a possibilidade dele repetir esse comportamento, necessário para sua sobrevivência e perpetuação, diante dos citados sinais.

O SOE é um exemplo de sistema de satisfação com um papel essencial para a exploração, seus neurotransmissores (neuropeptídeos, como exemplo a endorfina) e receptores atuam diretamente na sensação do prazer e relaxamento no organismo após conquista de seu objetivo (Nestler et al., 2019). Como pode-se constatar nos experimentos realizados com abelhas Apis mellifera, em que elas aumentaram a exploração após receberem dosagens da Morfina (MORF), agonista sintético das moléculas de endorfina, que atua como estimulador de amplo espectro do SOE, se acoplando aos receptores dessas moléculas e mimetizando/potencializando a ação delas (Chen et al., 2014). No entanto, curiosamente, pesquisas apontaram a ausência do sistema de opioides endógenos em invertebrados, com o seu surgimento ocorrendo, geneticamente, a partir dos vertebrados, e seus receptores exclusivos a estes (Elphick et al., 2018; Mirabeau & Joly, 2013).

Diante do papel da sinalização de opioides endógenos no comportamento de exploração de invertebrados e da ausência dos seus receptores nesse grupo, a utilização de insetos eussociais como modelo de estudo para aprofundamento da temática mostra-se eficaz, uma vez que estes animais se concentram em grande quantidade de indivíduos por colônia e nessas colônias se dividem por categorias de trabalho, como exemplifica a classe de forrageadoras nas formigas, operárias responsáveis por buscar alimento. Dessa forma, torna-se possível estudar a variação desse comportamento de busca em operárias forrageadoras, em nível individual e em larga escala, especialmente em animais como as formigas da espécie *D. quadriceps* que exploram de forma solitária utilizando apenas de informações egocêntricas para se orientar. Portanto, o atual trabalho analisou o comportamento das formigas forrageadoras dessa espécie sobre o efeito de diferentes dosagens de MORF num ambiente sem pistas químicas, em laboratório.

Metodologia

Procedimento experimental

Foram utilizadas 72 operárias forrageadoras de *Dinoponera quadriceps*(méd. peso = 0,334g) (Azevedo, 2014) de três colônias (24 operárias por colônia), coletadas na Floresta Nacional de Nísia Floresta (6º5’S,35º12’O) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença: 88316-1). As colônias foram transportadas para o Laboratório de Biologia Comportamental - UFRN, instaladas em ninhos artificiais e as operárias identificadas com marcas coloridas sobre o abdômen. Após a instalação e aclimatação das colônias iniciamos a fase experimental.

Para a injeção dos tratamentos, as formigas foram imobilizadas em blocos de placas de poliuretano com alfinetes entomológicos sobrepondo-as de forma a fixá-las (sem danos físicos ao sujeito de estudo) (Figura 1). Posteriormente, os insetos foram anestesiados em gelo numa câmara fria (Frost et al, 2011). O

período de exposição ao frio variou entre 2 a 5 minutos (a depender do indivíduo).

Em seguida, o exoesqueleto da região pós-occipital esquerda foi sensibilizado usando uma micro retífica. Através do ferimento, foi usado um scalp (27 gauge) para acesso ao meio intracranial e administração de 0,20 microlitros da solução de morfina diluída em soro fisiológico 0,9% (em todos os tratamentos exceto “cirurgia” e “controle”), usando uma bomba de microinfusão. Por fim, reparamos a incisão com a resina silicone S10 + endurecedor S3 (Biodur) (Figura 2) para evitar contaminação da região, passível de infecção (Frank et al, 2023) e vazamento da solução.

Foram criados seis grupos de operárias pertencentes às três colônias para a realização dos experimentos com a morfina, sendo alocadas quatro operárias de cada colônia por grupo:

Grupo controle (CTRL) corresponde a operárias que não passaram por nenhum procedimento e/ou intervenção, para visualização dos comportamentos ditos normais durante os episódios de exploração.

Grupo cirurgia (CIRG) continha operárias que passaram pela sensibilização e perfuração na cabeça, e em seguida o orifício era fechado com resina.

Grupo cirurgia + salina (CISA) continha as operárias que receberam a cirurgia descrita acima e a aplicação de 0,20 microlitros de solução salina (soro fisiológico 0,9%). Em seguida o orifício era fechado com resina.

Grupo morfina 1 (MORF 1) continha operárias que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico que os grupos CIRG e CISA, mas nos 0,20 microlitros de solução salina estavam diluídos 0,005 g/ml de morfina. Após a injeção o orifício era fechado com resina.

Grupo morfina 2 (MORF 2) continha as operárias que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico que os grupos CIRG e CISA, mas nos 0,20 microlitros de solução salina estavam diluídos 0,01 g/ml de morfina. Após a injeção o orifício era fechado com resina.

Grupo morfina 3 (MORF 3) continha as operárias que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico que os grupos CIRG e CISA, mas nos 0,20 microlitros de solução salina estavam diluídos 0,02 g/ml de morfina. Após a injeção o orifício era fechado com resina.

Logo após o procedimento experimental, as formigas foram divididas pela seu respectivo tratamento, isoladas entre si no centro de bandejas brancas retangulares (28 com x 44 cm) e filmadas, em ângulo ortogonal, por dez minutos com Câmera WB 1080p conectada a um computador (Figura 2).

Etograma

Para a coleta de dados, foi criado um etograma utilizando uma subamostra de 16 videos do experimento, escolhidos aleatoriamente, na qual anotou-se os comportamentos expressados, resultando na divisão de 8 categorias de comportamento: Contorção, Limpeza, Curvatura de abdômen, Eversão do labrum, Abertura de mandíbula, Ficar parada, Tigmotaxia e Caminhar (Tabela 1).

Coleta de dados comportamentais

Os registros foram analisados em dois softwares de análise de vídeos, o BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software) versão 8.27.1, utilizando o etograma construído como parâmetro para registrar os comportamentos demonstrados, e o AnimalTA versão 3.2.2 com a função de mapear e coletar dados do movimento e da velocidade da formiga durante a gravação.

Análise de dados

Todas as análises de dados foram realizadas usando o software R versão 4.5.1 (R Core Team, 2025), e assumiram um nível de significância de 5%. Para investigar como a expressão comportamental e a movimentação variam de acordo com a concentração de Morfina, foram construídos modelos lineares mistos sob distribuição de Poisson.

Resultados e Discussões

A análise dos comportamentos observados utilizando o Etograma (Tabela 1) demonstrou o comportamento de caminhada, ligado diretamente à exploração, como o comportamento mais frequente apresentado pelas operárias do grupo controle (fig. 3). Seguindo o esperado, uma vez que as formigas foram expostas a um ambiente desconhecido (a bandeja estéril do experimento) e, portanto, tendem a exploração nesse ambiente devido a falta de pistas de navegação conhecidas, necessárias para encontrar o seu ninho (Azevedo et al., 2022). Nos grupos (cirurgia; cirurgia + salina), o comportamento com maior incidência foi o de limpeza (Figura 3, $P<0,05$), expondo a influência do processo de acesso intracranial na alteração da ação do animal. Além do mais, a limpeza das antenas foi registrada com destaque, onde estão presentes os órgãos sensoriais olfativos importantes para a navegação das formigas, cujo o funcionamento depende de higienização periódica para evitar o acúmulo de sujeiras (Mizutani et al. 2021), o aumento e a repetição dessa manutenção em decorrência da incisão, sugere um padrão de estereotipia, uma forma repetitiva do indivíduo tentar voltar ao seu estado ótimo após passar por alguma forma de estresse (Mason et al., 2006).

A causa da estereotipia como resposta ao estresse em animais é, usualmente, afirmada como infundada, sem associação a qualquer função imediata e aparente. Entretanto, em alguns trabalhos esse comportamento é atrelado a uma maneira do animal regular seu bem estar através da repetição de ações que,

provavelmente, ocasionam liberação de neurotransmissores nas vias relacionadas ao prazer (como a de SOE) (Rose et al., 2017; Mason et al., 2006).

Em nossos experimentos a administração do agonista de endorfina resultou em uma uma redução dose-dependente (0,005 g/ml, 0,01 g/ml, 0,02 g/ml) no comportamento de autolimpeza ($P<0,05$). Em contraste com os outros grupos experimentais (Figura 3), as formigas que receberam esse tratamento exibiram uma maior atividade exploratória, o que está alinhado ao efeito esperado de um agente analgésico. Dessa forma, a mitigação da estereotipia pela morfina permite que os indivíduos recuperem sua capacidade locomotora, o que indica que a diminuição da autolimpeza reflete uma redução real da nocicepção, e não apenas um efeito secundário de sedação.

Por fim, nossos resultados são intrigantes, tendo em vista que Elphick et al., (2018), bem como Mirabeau & Joly (2013) apontam o surgimento do SOE, geneticamente, a partir dos vertebrados. Nossos resultados apontam modificações comportamentais por provável ligação de agonista de neuropeptídeos a receptores em cérebro de formigas. Dessa forma, corroborando com o trabalho de Gibbons (2022), em que sugere a presença e a acoplação desses neurotransmissores em receptores de outras vias neurais para explicar os seus efeitos na fisiologia desses sujeitos.

Conclusão

Esses resultados explicitam os efeitos da sinalização de opioides endógenos no comportamento das formigas forrageadoras da espécie *Dinoponera quadriceps*, mostrando que a aplicação de um agonista causou a redução de comportamentos atrelados a estresse e o aumento da exploração, possivelmente devido à ligação de seus neuropeptídeos a receptores de outras, prováveis, vias neurais. Futuros estudos poderão aprofundar sobre quais são esses receptores e suas vias.

Referências

AZEVEDO, Dina Lillia Oliveira de. Decisões comportamentais em contexto de forrageamento de *Dinoponera quadriceps*. 2014. 85f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

AZEVEDO, D. L. O. et al. Effect of Chemical and Visual Cues in the Maze Performance of the Ant *Dinoponera quadriceps*. Journal of Insect Behavior, v. 35, n. 4, p. 103–113, 1 jul. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10905-022-09803-6.

CHEN, Y.; FU, Y.; YANG, H. et al. Effects of chronic morphine treatment on olfactory conditioning paradigm, locomotor activity, and sucrose responsiveness in honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Insect Behavior, v. 27, p. 791–803, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10905-014-9468-y.

ELPHICK, M. R.; MIRABEAU, O.; LARHAMMAR, D. Evolution of neuropeptide signalling systems. Journal of Experimental BiologyCompany of Biologists Ltd, , 1 fev. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1242/jeb.151092.

FRANK, E. T. et al. Targeted treatment of injured nestmates with antimicrobial compounds in an ant society. Nature Communications, v. 14, n. 1, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41467-023-43885-w

FROST, E. H.; SHUTLER, D.; HILLIER, N. K. Effects of cold immobilization and recovery period on honeybee learning, memory, and responsiveness to sucrose. Journal of Insect Physiology, v. 57, n. 10, p. 1385–1390, out. 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.001.

GIBBONS, M. et al. Can insects feel pain? A review of the neural and behavioural evidence. In: Advances in Insect Physiology. [s.l.] Academic Press Inc., 2022. v. 63p. 155–229. Disponível em: https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2022.10.001.

GUERRIERI, F. J.; D'ETTORRE, P. The mandible opening response: Quantifying aggression elicited by chemical cues in ants. Journal of Experimental Biology, v. 211, n. 7, p. 1109–1113, abr. 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1242/jeb.008508.

LANAN, M. Spatiotemporal resource distribution and foraging strategies of ants (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News, v. 20, p. 53-70, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.25849/myrmecol.news_020:053

MASON, G.; RUSHEN, J. Stereotypic animal behaviour: Fundamentals and applications to welfare: Second edition. 2006.

MIRABEAU, O.; JOLY, J. S. Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, n. 22, 28 maio 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1073/pnas.1219956110.

MIZUTANI, H. et al. Antenna cleaning is essential for precise behavioral response to alarm pheromone and nestmate–non-nestmate discrimination in japanese carpenter ants (Camponotus japonicus). Insects, v. 12, n. 9, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/insects12090773.

MONNIN, T. et al. Pretender punishment induced by chemical signalling in a queenless ant. Nature, v. 419, n. 6902, p. 61–65, 5 set. 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nature00932.

NESTLER ERIC J.; HYMAN STEVEN E.; MALENKA ROBERT C. Molecular Neuropharmacology A Foundation for Clinical Neuroscience, 2009. DOI: 10.1036/0071481273.

PYKE, G. H. Optimal foraging theory – Introduction. In: BREED, M. D.; MOORE, J. (Eds.). Encyclopedia of Animal Behavior. p. 601–603. Academic Press, 2010.

R Core Team (2025). _R: A Language and Environment for Statistical Computing_. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

ROSE, P. E.; NASH, S. M.; RILEY, L. M. To pace or not to pace? A review of what abnormal repetitive behavior tells us about zoo animal management. Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research, v. 20, p. 11–21, 1 jul. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.02.007.

SIMPSON, E. H.; BALSAM, P. D. The behavioral neuroscience of motivation: An overview of concepts, measures, and translational applications. Current Topics in Behavioral Neurosciences, v. 27, p. 1–12, 1 jun. 2016. DOI: 10.1007/7854_2015_402.

TRANIELLO, J. F. A. Foraging strategies of ants. Annual Review of Entomology, v. 34, p. 191-210, 1989. DOI: 10.1146/annurev.en.34.010189.001203.

YAMANAKA, O. et al. Ants alter collective behavior after feeding and generate shortcut paths on a two-dimensional foraging area. Frontiers in Physics, Lausanne, v. 10, art. 896717, 11 maio. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fphy.2022.896717.

Anexos

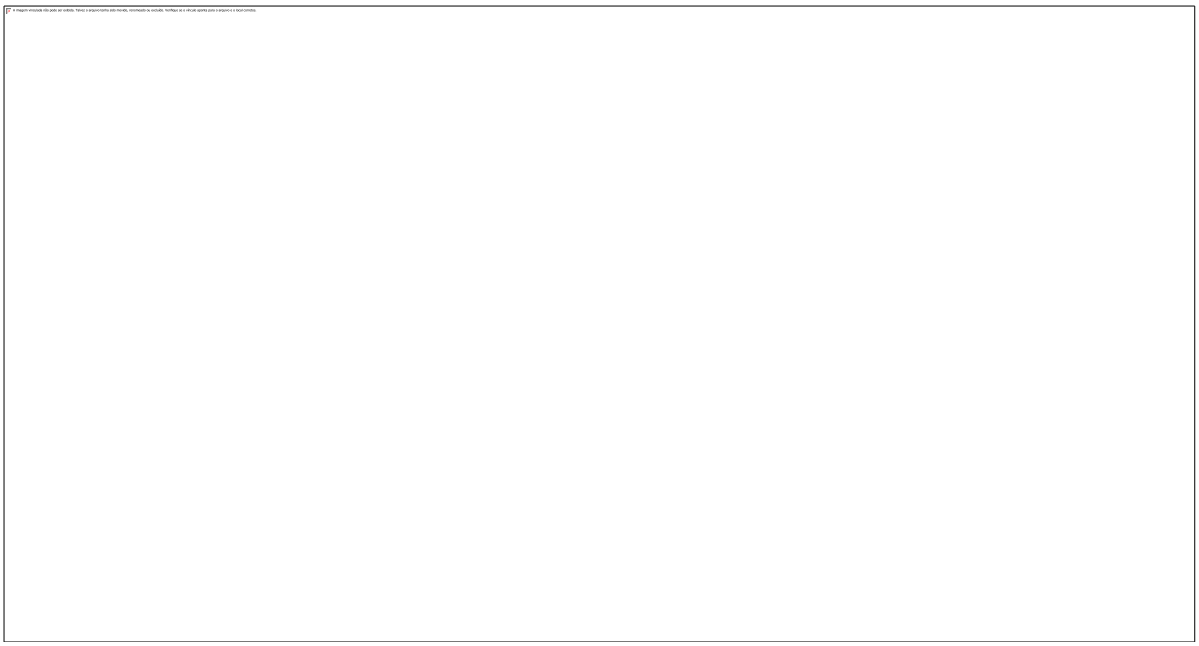


Figura 1. Esquema da imobilização das formigas em blocos de placas de poliuretano com alfinetes entomológicos para os procedimentos experimentais. Fonte: autoria própria, 2026.



Figura 2. Esquema do procedimento experimental. Legenda: 1. anestesia do indivíduo na câmara fria; 2. acesso intracranial e administração da solução; 3. reparo da incisão com resina; 4. registros dos comportamentos. Fonte: autoria própria, 2026.



Figura 3. Ocorrência média dos comportamentos observados em cada tratamento do experimento. Legenda: As barras de erro representam intervalos de confiança da média. Fonte: autoria própria, 2026.



Tabela 1 - Comportamentos observados durante o estudo.Fonte:Autoria própria, 2026.

CÓDIGO: HS0722

AUTOR: LYSSANDRA CARDOSO DA PAZ

ORIENTADOR: FELIPE NALON CASTRO

TÍTULO: NAVEGANDO ENTRE O PRESTÍGIO E A DOMINÂNCIA: A RELAÇÃO ENTRE AUTOFACETAS DE STATUS E TRAÇOS DE PERSONALIDADE

Resumo

A Teoria dos Motivos Sociais Fundamentais propõe a existência de 7 motivos básicos - autoproteção, evitação de doenças, afiliação, status, retenção de parceiros e cuidado parental -, que guiam o comportamento humano diante dos desafios da vida social, a partir de pistas endógenas e ambientais, como a personalidade. O status em específico, quando está ativado, direciona o indivíduo para manutenção ou ascensão da sua posição hierárquica. Para isso, ele se utiliza de duas estratégias: o prestígio e a dominância. Enquanto esse diz respeito ao reconhecimento do grupo por via da aquisição de habilidades necessárias, este, identifica-se por via da coerção e abuso de poder. Nesse sentido, a personalidade vem sendo apontada como uma das principais características relacionadas à adoção de uma estratégia. Para tanto, este estudo objetiva investigar a relação entre as facetas dominância e prestígio e os traços de personalidade do HEXACO, dado a pouca visibilidade desse instrumento nas pesquisas. Hipotetizou-se que as dimensões prestígio e dominância estavam associadas positivamente e negativamente, respectivamente, aos traços honestidade-humildade, extroversão, agradabilidade e altruísmo. Conclui-se haver uma corroboração parcial com a hipótese dado à associação positiva entre prestígio, altruísmo, honestidade-humildade e, principalmente, extroversão; e à relação negativa entre dominância, agradabilidade, altruísmo e, notavelmente, honestidade-humildade.

Palavras-chave: Teoria dos Motivos Sociais Fundamentais. Status social. Personalidade.

TITLE: NAVIGATING BETWEEN PRESTIGE AND DOMINANCE: THE RELATIONSHIP BETWEEN STATUS FACETS AND PERSONALITY TRAITS

Abstract

The Fundamental Social Motives Theory proposes the existence of seven basic motives—self-protection, disease avoidance, affiliation, status, mate retention, and parental care—that guide human behavior in the face of social challenges, based on endogenous and environmental cues such as personality. Status, specifically, when activated, directs the individual toward maintaining or elevating their hierarchical position. To achieve this, the individual employs two strategies: prestige and dominance. While the former relates to gaining group recognition through the acquisition of necessary skills, the latter is characterized by coercion and the abuse of power. In this context, personality has been identified as a key factor influencing the choice of strategy. Therefore, this study aims to investigate the relationship between the facets of dominance and prestige and the HEXACO personality traits, given the limited use of this instrument in research. It was hypothesized that the prestige and dominance dimensions would be positively and negatively associated, respectively, with the traits of Honesty-Humility, Extraversion, Agreeableness, and Altruism. The findings partially support the hypothesis, given the positive association between prestige and Altruism, Honesty-Humility, and—most notably—Extraversion; and the negative relationship between dominance and Agreeableness, Altruism, and—most notably—Honesty-Humility.

Keywords: Fundamental Social Motives Theory. Social status. Personality.

Introdução

Desde sempre a humanidade enfrentou desafios a sua sobrevivência e, a fim de entender como eles foram e são superados, Kenrick e colaboradores (2010), revisitando a pirâmide de Maslow e se baseando na Teoria da História de Vida contemporânea, propuseram a Teoria dos Motivos Sociais Fundamentais. Ela indica a existência de 7 motivos básicos - autoproteção, evitação de doenças, afiliação, busca por status, retenção de parceiros e cuidado parental - para lidar com os custos e benefícios da vida em grupo. Diferentemente da hipótese da pirâmide de Maslow, onde um motivo sobrepunha-se ao anterior conforme o desenvolvimento, a Teoria dos Motivos Sociais Fundamentais sugere que eles são ativados conforme pistas endógenas (como idade, sexo e personalidade) e exogénas (por exemplo o contexto social e a história de vida) de maneira fluida (Neel et al., 2016).

Os motivos de autoproteção, evitação de doenças e afiliação são os primeiros motivos que aparecem durante o desenvolvimento. Eles dizem sobre as necessidades fisiológicas básicas como afiliação, fome, sede, proteção contra ameaças ambientais e sociais, e pertencimento grupal. A busca por status, por sua vez, é predecessora da busca de parceiros e do cuidado parental (Kenrick et al., 2010; Neel et al., 2016). Assim, quanto maior for a posição hierárquica de um indivíduo em sua sociedade, maior será o controle e a quantidade de recursos disponíveis para ele, aumentando, consequentemente, a sua probabilidade de reprodução (Durkee, 2025; Maner, 2017). Nesse sentido, quando essa motivação está proeminentemente ativada, o comportamento volta-se à busca por status, podendo ocorrer através de duas estratégias: o prestígio e a dominância (Cheng et al., 2010).

O prestígio é uma estratégia caracterizada pelo reconhecimento de terceiros sobre a importância do indivíduo dentro do grupo. Uma vez que ela depende de habilidades específicas não violentas, como a inteligência, ela varia conforme o contexto. A

dominância, por sua vez, impõe-se pelo abuso de poder, medo e coerção, não sendo, para tanto, tão volátil (Körner et al., 2025).

Ambas as estratégias, construídas evolutivamente, são estabelecidas conforme o desenvolvimento do indivíduo e envolvem tanto aspectos físicos, como o capital físico, quanto psicológicos, como os traços de personalidade. Atualmente, a literatura vem investigando quais são esses fatores que levam a adoção de uma em detrimento da outra e, embora já apresentem estudos correlacionais, ainda não é evidente como isso ocorre. Grande parte das pesquisas voltadas à dimensão da personalidade, característica central deste estudo, fundamentam-se em torno da Teoria dos Cinco Grandes Fatores da Personalidade (Big Five), negligenciando outras teorias como o HEXACO, que vem apresentando novas perspectivas explicativas (Durkee & Buss, 2025; Mener, 2017). Além de estar alinhado com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU da Educação de Qualidade, estudos exploratórios como este são importantes para examinar como certas características de personalidade pró-sociais se relacionam com as estratégias de prestígio e dominância. Para tanto, objetiva-se investigar as relações entre os traços de personalidade honestidade-humildade, extroversão, agradabilidade e altruísmo e as dimensões de autoconceito de dominância e prestígio. Hipotetiza-se que o prestígio está positivamente associado a esses traços, enquanto a dominância apresenta associações negativas.

Metodologia

Esse trabalho é um recorte do projeto de pesquisa intitulado “Explorando as interconexões entre personalidade, ambiente e escolha da profissão”. Participaram deste estudo 200 pessoas. Destes 133 eram mulheres (M = 28,8; DP = 11,5), 58 eram homens (M = 26,5; DP = 8,78) e 9 pessoas não se identificaram com classificações binárias de gênero (M = 22,3; DP = 3,24) (Imagem 1). Com relação a classificação brasileira proposta pelo IBGE de cor de pele, 54% dos participantes se autodeclararam brancos, 36% pardos e 10% pretos (Imagem 2). Não houveram participantes que se autodeclararam amarelos (descendência asiática) ou indígenas.

Para a análise calculou-se a quantidade de participantes pelo software G*Power 3.1 (Faul et al., 2007), considerando os parâmetros: valor alfa 5%, poder esperado em 95% e medida de efeito (f) 0.25. A amostra foi por conveniência tendo como critério de inclusão pessoas acima de 18 anos, brasileiras e alfabetizadas. A coleta de dados foi realizada no período de março a novembro de 2025. Os dados foram armazenados em planilha de dados do Excel e analisados no software Jamovi.

Os questionários utilizados para realização do estudo foram disponibilizados online via Jotform, sendo compartilhados nas redes sociais, com duração aproximada de 30 minutos. Nele, além da assinatura do TCLE, os participantes responderam perguntas sociodemográficas, autoavaliaram seus traços de personalidade honestidade-humildade, extroversão, agradabilidade e altruísmo através do Inventário de Personalidade HEXACO-PI-R, bem como autoavaliaram as facetas dominância e prestígio através do Questionário Dominância-Prestígio (Körner et al., 2022).

O questionário sociodemográfico foi composto por perguntas sobre o gênero, idade e autodeclaração de cor de pele, conforme classificação do IBGE (2010). O instrumento HEXACO-PI-R é composto por 60 questões respondidas em escala Linkert de 5 pontos, sendo 1 “discordo fortemente” e 5 “concordo fortemente”, que abarcam as seguintes dimensões: honestidade-humildade, contemplando características como sinceridade, modéstia e justiça; emotividade, caracterizada pela empatia e o apego emocional; extroversão, caracterizada por proatividade e sociabilidade; amabilidade, caracterizada paciência, cooperação e tolerância; conscienciosidade, caracterizada pela disciplina, planejamento e organização; e abertura à experiência, caracterizada pela criatividade e curiosidade. Para este estudo também foram adicionadas 4 questões relativas ao altruísmo do instrumento HEXACO-100. No presente estudo considerou-se apenas as subescalas referentes aos traços honestidade-humildade, extroversão, agradabilidade e altruísmo. Ambos os instrumentos foram validados para o Brasil por Costa e colaboradores (2019). O Questionário Dominância-Prestígio possui 15 itens respondidos em escala Linkert de 7 pontos que varia de 1 “discordo fortemente” à 7 “concordo fortemente”. Ela foi proposta por Körner e colaboradores (2022)para avaliar as facetas do autoconceito referente a dominância e prestígio e está em processo de validação para o público brasileiro. Nesse estudo, foi utilizada a versão traduzida e adaptada desse instrumento para a população brasileira.

Resultados e Discussões

O objetivo deste estudo foi investigar as relações entre os traços de personalidade honestidade-humildade, extroversão, agradabilidade e altruísmo e as dimensões de autoconceito de dominância e prestígio. Hipotetizou-se que o prestígio estaria positivamente associado a esses traços, enquanto a dominância apresentaria associações negativas.

Os resultados indicaram correlação positiva e significativa entre prestígio e dominância ($r = .236$, $p < .001$). Em relação aos traços de personalidade, o prestígio apresentou correlações positivas e significativas com honestidade-humildade ($r = .181$, $p = .010$), extroversão ($r = .427$, $p < .001$) e altruísmo ($r = .241$, $p < .001$). Não foi observada correlação significativa entre prestígio e agradabilidade ($r = .070$, $p = .323$). A dominância, por sua vez, apresentou correlações negativas e significativas com honestidade-humildade ($r = −.143$, $p = .043$), agradabilidade ($r = −.395$, $p < .001$) e altruísmo ($r = −.291$, $p < .001$). Não foi encontrada associação significativa entre dominância e extroversão ($r = −.038$, $p = .594$). Assim, de modo geral, os resultados ofereceram suporte parcial às hipóteses propostas, uma vez que as associações ocorreram nas direções esperadas para a maioria dos traços investigados, com exceção das relações entre prestígio e agradabilidade e entre dominância e extroversão (Imagem 3).

A Teoria dos Motivos Sociais Fundamentais propõe que os seres humanos possuem sistemas motivacionais associados à resolução de desafios sociais recorrentes, cuja ativação pode variar em função de características individuais e de condições ambientais (Kenrick et al., 2010; Neel et al., 2016). Entre esses desafios está a obtenção de status, que pode favorecer o acesso a recursos e oportunidades socialmente relevantes. A posição hierárquica pode ser alcançada por diferentes estratégias, entre as quais se destacam o

prestígio, baseado no reconhecimento voluntariamente conferido a indivíduos cujas habilidades e conhecimentos são valorizados pelo grupo, e a dominância, baseada na imposição por meio de intimidação, ameaça ou coerção. Embora constituam estratégias distintas de navegação hierárquica, diferenças individuais em sua expressão estão associadas a características físicas e psicológicas, incluindo traços de personalidade (Durkee & Buss, 2025; Kenrick et al., 2010; Körner et al., 2025). Nesse sentido, os resultados do presente estudo contribuem para compreender como diferentes traços de personalidade se associam à dominância e ao prestígio no contexto brasileiro.

Estudos anteriores indicam que dominância e prestígio apresentam perfis distintos de personalidade. Enquanto o prestígio tem sido associado a características relacionadas à afiliação e ao reconhecimento social, a dominância apresenta associações com menor agradabilidade, agressividade, manipulação e traços da Tríade Negra (Maner, 2017). Em consonância com essa diferenciação, os resultados do presente estudo indicaram padrões distintos de associação com os traços investigados: o prestígio apresentou relações positivas com extroversão, altruísmo e honestidade-humildade, enquanto a dominância se associou negativamente à agradabilidade, ao altruísmo e à honestidade-humildade. Entre essas relações, destacou-se a associação entre prestígio e extroversão ($r = .427$), a mais forte observada para essa dimensão. Esse resultado converge com Durkee e Buss (2025), que também identificaram uma associação direta entre extroversão e prestígio. Considerando que o prestígio envolve a obtenção de influência por meio do reconhecimento, respeito e admiração voluntariamente conferidos pelos demais, características associadas à maior sociabilidade e desenvoltura nas interações podem favorecer oportunidades para a demonstração de competências valorizadas e, consequentemente, para a obtenção de reconhecimento social (Grosz et al., 2024).

Em relação à dominância, destacou-se sua associação negativa com agradabilidade ($r = −.395$), a mais forte observada para essa dimensão, seguida pela associação negativa com altruísmo ($r = −.291$). Esse padrão é consistente com a caracterização da dominância como uma estratégia de obtenção de status baseada no controle, na intimidação e na coerção, em contraste com características relacionadas à cooperação e à consideração pelas necessidades dos outros. Em consonância com esses achados, Cheng et al. (2010) observaram associações negativas da dominância tanto com agradabilidade quanto com características pró-sociais, incluindo altruísmo, cooperação e disposição para ajudar. Os autores argumentam que, enquanto a influência baseada na dominância pode ser sustentada pela capacidade de impor custos e evocar medo, a prosocialidade desempenha papel mais central na obtenção de prestígio, que depende do respeito e da deferência voluntariamente concedidos pelos demais. Assim, os resultados do presente estudo reforçam a distinção entre as duas estratégias de status ao indicar que maiores níveis de dominância estão associados a menores níveis de características voltadas à cooperação e à consideração pelas necessidades dos outros.

A honestidade-humildade também apresentou associações nas direções esperadas com ambas as dimensões, embora de pequena magnitude, relacionando-se positivamente ao prestígio ($r = .181$) e negativamente à dominância ($r = −.143$). A associação negativa com a dominância converge com evidências recentes que identificaram menores níveis de honestidade-humildade diretamente associados a essa estratégia de navegação hierárquica (Durkee & Buss, 2025). No modelo HEXACO, esse traço envolve características como sinceridade, justiça, menor interesse por riqueza e privilégios e modéstia, enquanto níveis mais baixos estão relacionados à maior disposição para manipular ou explorar outras

pessoas em benefício próprio (Ashton et al., 2014). Nesse sentido, sua associação negativa com a dominância é coerente com uma estratégia de obtenção de status caracterizada pelo uso de coerção e imposição sobre os demais. Por outro lado, embora a associação positiva entre honestidade-humildade e prestígio tenha ocorrido na direção prevista, sua pequena magnitude sugere cautela ao considerar esse traço como uma característica central do prestígio. Em conjunto, os resultados indicam que a honestidade-humildade se relaciona de maneira distinta às duas dimensões de status, mas de forma mais modesta do que as associações observadas para outros traços investigados.

Duas das associações inicialmente previstas não foram observadas: entre prestígio e agradabilidade ($r = .070$, $p = .323$) e entre dominância e extroversão ($r = -.038$, $p = .594$). Embora estudos anteriores tenham encontrado relações positivas entre prestígio e agradabilidade (Cheng et al., 2010; Tackett et al., 2026), evidências recentes não identificaram uma relação direta entre essas variáveis quando consideradas simultaneamente outras características individuais (Durkee & Buss, 2025), indicando que essa associação pode ser menos consistente do que inicialmente esperado. Diferenças na operacionalização da agradabilidade também devem ser consideradas, uma vez que, no modelo HEXACO, esse fator enfatiza características como perdão, gentileza, flexibilidade e paciência e não corresponde integralmente à agradabilidade avaliada em modelos de cinco fatores (Ashton et al., 2014). De modo semelhante, embora estudos anteriores tenham associado a extroversão tanto ao prestígio quanto à dominância (Cheng et al., 2010), evidências mais recentes identificaram uma relação direta desse traço apenas com o prestígio (Durkee & Buss, 2025). Assim, a ausência dessas associações no presente estudo deve ser interpretada com cautela, uma vez que a literatura apresenta resultados heterogêneos e utiliza diferentes operacionalizações tanto dos traços de personalidade quanto das estratégias de status.

Apesar dos padrões distintos de associação com os traços de personalidade, o prestígio e a dominância apresentaram uma correlação positiva de pequena magnitude ($r = .236$), sugerindo que essas dimensões, embora representem formas distintas de navegação hierárquica, não são necessariamente excludentes. Esse resultado é compatível com evidências anteriores de associações positivas entre as duas estratégias, possivelmente relacionadas ao fato de ambas constituírem caminhos para a obtenção de posições hierárquicas elevadas (Maner, 2017). Ao mesmo tempo, a literatura apresenta resultados divergentes quanto à relação entre dominância e prestígio, incluindo estudos nos quais não foram observadas associações entre elas. Assim, os achados reforçam a importância de compreender essas dimensões como estratégias distintas que podem coexistir em um mesmo indivíduo, embora sejam necessários novos estudos para investigar as condições em que elas se relacionam e como podem interagir na busca por status.

Conclusão

Em síntese, os resultados oferecem suporte parcial às hipóteses e indicam que dominância e prestígio apresentam padrões distintos de associação com a personalidade. O prestígio mostrou-se especialmente relacionado à extroversão e, em menor magnitude, ao altruísmo e à honestidade-humildade, enquanto a dominância esteve mais fortemente associada a menores níveis de agradabilidade e altruísmo, além de apresentar uma relação negativa, embora pequena, com honestidade-humildade. Esses achados reforçam a compreensão de

dominância e prestígio como formas distintas de navegação hierárquica, associadas a diferentes características individuais, sem que constituam estratégias necessariamente excludentes. Ao mesmo tempo, a ausência das relações previstas entre prestígio e agradabilidade e entre dominância e extroversão evidencia que as associações entre personalidade e estratégias de status não são uniformes, destacando a importância de considerar as especificidades conceituais e de mensuração dos traços investigados. Nesse sentido, o estudo amplia as evidências sobre as diferenças individuais relacionadas à dominância e ao prestígio no contexto brasileiro e contribui para a compreensão da personalidade como uma das características associadas às diferentes formas pelas quais os indivíduos se posicionam e navegam em hierarquias sociais.

Referências

ASHTON, Michael C.; LEE, Kibeom; DE VRIES, Reinout E. The HEXACO Honesty-Humility, Agreeableness, and Emotionality Factors. Personality and Social Psychology Review, v. 18, n. 2, p. 139-152, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1177/1088868314523838.

CHENG, Joey T.; TRACY, Jessica L.; HENRICH, Joseph. Pride, personality, and the evolutionary foundations of human social status. Evolution and Human Behavior, v. 31, n. 5, p. 334–347, set. 2010.

COSTA, A. R. L.; JESUÍNO, A. D. S. A.; DE SOUZA LIMA, N. R.; SHU, F. Adaptation and validation of HEXACO-PI-R to a Brazilian sample adaptation of HEXACO-PI-R to Brazilian sample. Personality and Individual Differences, v. 147, p. 280-284, 2019.

DURKEE, Patrick K.; BUSS, David M. Hierarchy navigation: Individual differences in tactics, strategies, and traits. Human Nature, v. 36, n. 3, p. 503–523, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12110-025-09506-9.

FAUL, Franz et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods, v. 39, n. 2, p. 175–191, maio 2007. Disponível em: doi.org.

GROSZ, Mitja P.; VAN AERT, Robbie C. M.; BACK, Mitja. A meta-analytic review of the associations of personality, intelligence, and physical size with social status. Psychological Bulletin, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1037/bul0000416.

KENRICK, Douglas T.; GRISKEVICIUS, Vladas; NEUBERG, Steven L.; SCHALLER, Mark. Renovating the pyramid of needs. Perspectives on Psychological Science, v. 5, n. 3, p. 292–314, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1177/1745691610369469.

KÖRNER, Robert; OVERBECK, Jennifer R.; SCHÜTZ, Astrid. Structuring hierarchy concepts: Evaluating measures of power, status, dominance, and prestige on the basis of an integrative model and systematic literature review. Psychological Bulletin, v. 151, n. 3, p. 322–364, 2025.

KÖRNER, Robert; HEYDASCH, Timo; SCHÜTZ, Astrid. Dominance and prestige as self-concept facets. Journal of Personality Assessment, v. 105, n. 5, p. 590-609, 2022.

MANER, Jon K. Dominance and prestige: A tale of two hierarchies. Current Directions in Psychological Science, v. 26, n. 6, p. 887–907, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1177/0963721417714323.

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. Brasília, DF: Centro de Informações das Nações Unidas para o Brasil, 2016. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/91863-agenda-2030-para-o-desenvolvimento-sustent%C3%A1vel. Acesso em: 27 ago. 2026.

NEEL, Rebecca; KENRICK, Douglas T.; WHITE, Andrew E.; NEUBERG, Steven L. Individual differences in fundamental social motives. Journal of Personality and Social Psychology, v. 110, n. 6, p. 887–907, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1037/pspp0000068.

TACKETT, Jennifer L.; BRANDES, C. M.; REARDON, K. W.; SHIELDS, A. N. Dominance and Prestige Motivations to Lead in Adolescence. Journal of Personality, v. 94, n. 4, p. 665–677, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.1111/jopy.70029.

Anexos

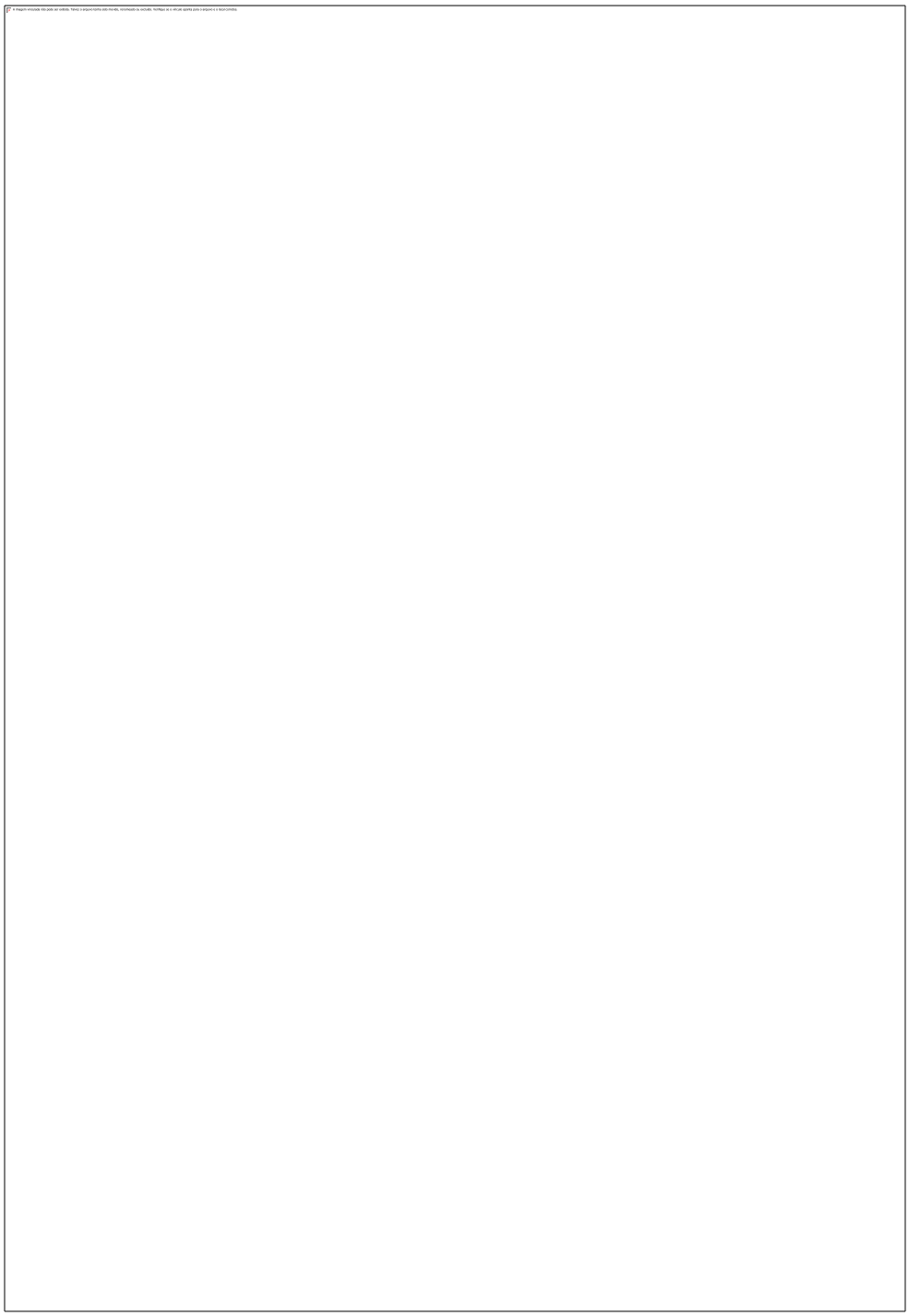


Imagem da tabela de correlações do prestígio e da dominância com os traços de personalidade

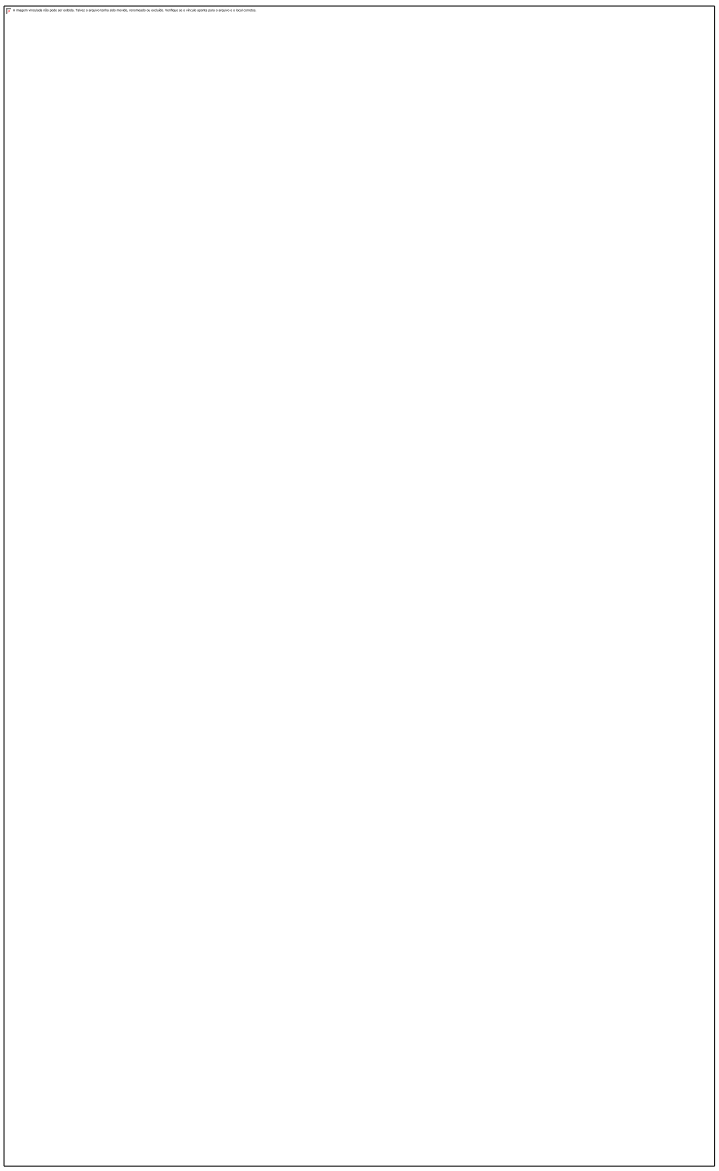


Imagem da tabela com a análise descritiva da amostra por gênero

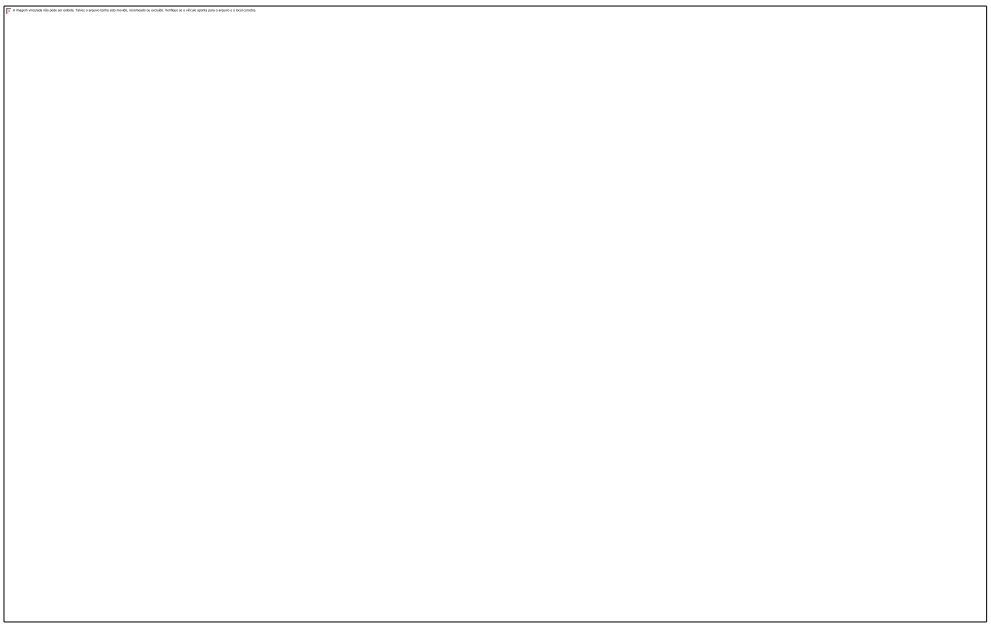


Imagem da tabela da análise descritiva da amostra por cor de pele

CÓDIGO: HS1149

AUTOR: JOSIVAN BERNARDINO SILVA DE FRANCA

ORIENTADOR: ROVENA CLARA GALVAO JANUARIO ENGELBERTH

TÍTULO: Desvendando a resiliência cerebral: O papel do ambiente enriquecido e do exercício físico na preservação da cognição, ritmo biológico e neuroquímica em ratos idosos.

Resumo

O envelhecimento é um processo natural e progressivo que afeta os organismos vivos de forma individual. As alterações morfológicas e funcionais que caracterizam o envelhecimento se relacionam com o declínio cognitivo e com as alterações comportamentais observadas nos idosos. Nesse sentido, terapias alternativas, como enriquecimento ambiental e exercício físico, têm se destacado como estratégias para atenuar os efeitos do envelhecimento. O objetivo deste trabalho é avaliar e comparar os efeitos do enriquecimento ambiental e do exercício físico sobre os domínios cognitivos e emocionais de ratos jovens e idosos. Para o grupo de enriquecimento ambiental, serão utilizados como itens brinquedos de madeiras, túneis de plástico e cobertura de cama extra. Para os grupos de Atividade Física, os animais terão acesso a esteiras ou rodas de exercício instaladas dentro de suas gaiolas, permitindo a atividade física voluntária.Todos os grupos passaram por uma avaliação comportamental nos testes de campo aberto e reconhecimento de objeto e ao final dos testes comportamentais, e posteriormente, terão os cérebros coletados para análise da expressão de substâncias neuroquímicas no hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala. Espera-se melhora cognitiva e comportamental nos animais idosos, assim como também melhorias no ritmo biológico e na plasticidade cerebral e além disso, espera-se que a combinação das intervenções possa potencializar esses efeitos.

Palavras-chave: Envelhecimento.Cognição.Enriquecimento ambiental.Atividade fisica.

TITLE: Unveiling brain resilience: The role of the enriched environment and physical exercise in the preservation of cognition, biological rhythm and neurochemistry in elderly rats.

Abstract

Aging is a natural and progressive process that affects living organisms individually. The morphological and functional changes that characterize aging are related to cognitive decline and behavioral changes observed in the elderly. In this sense, alternative therapies, such as environmental enrichment and physical exercise, have stood out as strategies to mitigate the effects of aging. The objective of this study is to evaluate and compare the effects of environmental enrichment and physical exercise on the cognitive and emotional domains of young and elderly rats. For the environmental enrichment group, wooden toys, plastic tunnels and extra bed cover will be used as items. For Physical Activity groups, animals will have access to treadmills or exercise wheels installed inside their cages, allowing voluntary physical activity. All groups underwent a behavioral evaluation in the open field tests and object recognition and at the end of the behavioral tests, and later, the brains will be collected for analysis of the expression of neurochemical substances in the hippocampus, prefrontal cortex and tonsil. Cognitive and behavioral improvement is expected in elderly animals, as well as improvements in biological rhythm and brain plasticity, and in addition, it is expected that the combination of interventions can potentiate these effects.

Keywords: Aging. Cognition. Environmental enrichment. Physical activity.

Introdução

O envelhecimento é caracterizado por alterações morfológicas e fisiológicas em todos os órgãos e tecidos, podendo desencadear limitações na funcionalidade do organismo.1 Estudos sobre o tema proporcionaram a discussão de diversas teorias a fim de tentar explicar os mecanismos envolvidos na formação e manutenção desse processo1,2. No entanto, apesar dessas teorias possuírem hipóteses distintas, comumente concordam que o envelhecimento é marcado por um processo natural, inevitável e progressivo.3

Apesar do processo de envelhecimento ser denominado universal, há várias questões que o torna heterogêneo. Em primeiro plano, é importante entender que esse processo afeta organismos de maneira pessoal, visto que há uma variedade de fatores, tanto internos quanto externos que interagem e podem modificar o organismo dos indivíduos.3 Além disso, o declínio do funcionamento dos sistemas que compõem o organismo ocorre de maneira desigual, promovendo ainda mais um aumento na quantidade de variáveis que dificultam o seu entendimento.4

O sistema nervoso central é um dos sistemas que mais sofrem impacto com o avanço da idade, principalmente no que diz respeito aos domínios cognitivos. A cognição pode ser caracterizada como um conjunto de habilidades que fornecem a capacidade de perceber, interpretar e armazenar informação no formato de conhecimento.5

Atualmente, tem sido destaque a utilização de terapias alternativas que promovam uma lentificação ou até mesmo a estagnação do declínio cognitivo.6 Roedores submetidos a

um protocolo de enriquecimento ambiental apresentaram melhorias significativas nos domínios cognitivos, principalmente no que diz respeito a aspectos que envolvam a retenção de memória e o processo de aprendizagem.7,8 Além disso, estudos utilizando animais idosos observaram uma melhora na capacidade exploratória e uma diminuição no comportamento do tipo ansioso.9,10 No entanto, apesar da literatura apresentar resultados positivos do enriquecimento ambiental em relação à neurogênese, é pouco conhecido os mecanismos de ação por trás de uma terapia que possui benefícios comportamentais tão importantes. Dito isso, se faz necessário uma padronização do tempo de exposição e dos itens utilizados durante o protocolo para entender melhor a delimitação dos benefícios da terapia utilizada.11 Além disso, existem algumas lacunas em relação às diferenças sexuais, já que a maioria dos estudos envolvendo o enriquecimento ambiental foram observados apenas em machos.

Um outro ponto que é englobado pelo o uso do enriquecimento ambiental é em relação a comparação desta com outras terapias alternativas, a fim de entender tanto de modo unitário, quanto de modo somatório, qual terapia pode beneficiar mais o indivíduo no que diz respeito a aspectos cognitivos e comportamentais. A atividade física, por sua vez, é amplamente utilizada como terapia não invasiva para aprimorar diversas funções cognitivas, incluindo memórias de longo e curto prazo12,13. Estudos têm investigado os efeitos de diferentes tipos de exercício, como aeróbicos e de resistência, em adultos14, e seu potencial para reduzir disfunções cognitivas em doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer15,16. O exercício agudo também tem demonstrado melhorar a função executiva em crianças e idosos17. Contudo, há pouco conhecimento sobre o efeito desses exercícios na melhoria dos ritmos biológicos e no processo de envelhecimento, especialmente quando observados a curto, médio e longo prazo, constituindo outra lacuna científica relevante.

Desse modo, torna-se importante a busca por conhecimentos a respeito de terapias não invasivas que possibilitam melhorias no desempenho cognitivo, entendendo os mecanismos neurais envolvidos na melhora comportamental em diferentes idades.

Metodologia

Este estudo empregará uma abordagem experimental para investigar os efeitos do enriquecimento ambiental e da atividade física em roedores idosos, abrangendo aspectos cognitivos, de ritmo biológico, neuroquímicos e morfológicos.
Utilizaremos ratos (Rattus novergicus) Wistar, divididos por faixa etária: jovens adultos (± 8 meses, para intervenção a longo prazo), idosos jovens (± 14 meses, para intervenção a médio prazo) e idosos (± 18 meses, para intervenção a curto prazo), com aproximadamente 18 animais por grupo. Os animais serão provenientes do biotério central do Centro de Biociências da UFRN. Todos os cuidados para evitar estresse ou sofrimento durante o manuseio dos animais serão rigorosamente adotados, seguindo as normas estabelecidas pela Lei Arouca de cuidado animal (2009). Este projeto será submetido à avaliação e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFRN), incluindo a inserção de animais para testes piloto.
Os animais serão alocados nos seguintes grupos experimentais:
Controles: Adultos jovens (± 8 meses); idosos jovens (± 14 meses) e idosos (± 18 meses).

Experimentais:
IL (Intervenção Longa - 6 meses)
IM (Intervenção Média - 3 meses)
IC (Intervenção Curta - 1 mês)
EA (Enriquecimento Ambiental)
AT (Atividade Física)
AT/EA (Atividade Física e Enriquecimento Ambiental combinados)
Durante os procedimentos experimentais, os animais ficarão na sala de avaliação cronobiológica do Laboratório de Estudos Neuroquímicos (LENq), em caixas que permitem o monitoramento de ritmos e a aplicação das intervenções. As condições de temperatura ambiente e umidade relativa do ar serão mantidas estáveis por ar-condicionado e exaustor.
Os animais designados para os grupos de Enriquecimento Ambiental (EA) serão alojados em gaiolas maiores, significativamente mais espaçosas que as gaiolas padrão. Nestas gaiolas, serão incluídos diversos objetos que estimulem a exploração, a interação social e o desafio cognitivo. Esses objetos, como túneis, plataformas, brinquedos e materiais de nidificação, variarão em forma, tamanho, cor e textura, sendo trocados periodicamente (por exemplo, semanalmente) para manter a novidade e evitar a habituação. O tempo de exposição ao enriquecimento ambiental dependerá do grupo experimental ao qual o animal pertence: intervenção longa (IL) por 6 meses, intervenção média (IM) por 3 meses, e intervenção curta (IC) por 1 mês.
Para os grupos de Atividade Física(AT), os animais terão acesso a esteiras ou rodas de exercício instaladas dentro de suas gaiolas, permitindo a atividade física voluntária. A duração e a intensidade da atividade serão monitoradas por sensores acoplados às rodas ou esteiras, que registrarão a distância percorrida ou o tempo de atividade. O tempo de exposição à atividade física dependerá do grupo experimental: intervenção longa (IL) por 6 meses, intervenção média (IM) por 3 meses, e intervenção curta (IC) por 1 mês.
Os registros da atividade locomotora serão realizados de forma contínua, 24 horas por dia, utilizando sensores infravermelhos instalados sobre as caixas dos animais. Os dados serão transferidos a um computador através de uma placa de aquisição de dados da National Instruments (NI PCI-6025E). O software Aschoff (desenvolvido pelo Laboratório de Cronobiologia - UFRN) contabilizará e armazenará os dados em séries temporais com intervalos de 5 minutos. Posteriormente, essas séries serão analisadas com os softwares El temps© (Antoni Díez-Noguera, Universitat de Barcelona) e STATISTIC 7, permitindo a avaliação de ritmos circadianos de atividade-repouso.
Análise Comportamental-Cognitiva dos Animais: Para avaliar os aspectos cognitivos de aprendizagem e memória, os animais serão submetidos a duas tarefas comportamentais amplamente utilizadas: (1) Tarefa de Esquiva Discriminativa do Labirinto em Cruz: Este teste (Silva; Frussa-Filho, 2000) avaliará a capacidade de aprendizagem associativa e a memória de evitação, verificando se as intervenções promovem melhorias nesse parâmetro; (2) Teste de Reconhecimento de Objetos: Este teste (Ennaceur; Delacour, 1988) avaliará a memória de reconhecimento visual dos animais, permitindo observar o impacto das intervenções na capacidade de diferenciar objetos novos de familiares.
Ao final do período de tratamento, os animais serão anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intramuscular. Com o animal profundamente anestesiado, será realizada uma perfusão transcardíaca e após a perfusão, os cérebros serão removidos por craniotomia e pós-fixados em paraformaldeído a 4% em PB 0,1 M, pH 7,4, a 4ºC por 24 horas. Em seguida, serão crioprotegidos em sacarose 30% a 4ºC por 48 horas.
Os cérebros serão congelados a -70ºC e, posteriormente, seccionados em criostato a -

20ºC em cortes frontais de 30 µm. As secções serão distribuídas sequencialmente em 6 compartimentos, garantindo uma amostragem uniforme (aproximadamente 180 µm entre cada secção analisada). Os cortes serão armazenados em solução anticongelante (etilenoglicol em tampão fosfato) a 4ºC até as reações de imunohistoquímica e análises morfológicas. Para a imunohistoquímica, os cortes serão incubados com anticorpos primários monoclonais de interesse para demonstrar resposta glial, plasticidade neuronal e nível de atividade e população neuronal específica.
As imagens serão capturadas por microscopia de campo claro (Olympus Microscope, BX-41) com câmera digital (Nikon, DXM-1200) para contagem celular e densiometria óptica relativa utilizando o programa Image J (versão 1.46i, NIH).
Para análise estatística, inicialmente, serão aplicados testes de normalidade e homogeneidade dos dados. Em caso de distribuição normal, comparações múltiplas entre os grupos serão realizadas por Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste post-hoc de Tukey. Caso haja desvio da normalidade, testes não paramétricos correspondentes serão utilizados. Diferenças serão consideradas estatisticamente significativas com valor de $p<0,05$.

Resultados e Discussões

Espera-se que a continuidade do estudo demonstre efeitos benéficos do enriquecimento ambiental e da atividade física sobre as alterações cognitivas e comportamentais associadas ao envelhecimento. Considerando que os animais serão submetidos a diferentes períodos de intervenção a curto, médio e longo prazo é possível que os benefícios apresentem uma relação com o tempo de exposição às intervenções. Estudos recentes indicam que o enriquecimento ambiental pode favorecer a aprendizagem e a memória em modelos animais, estando esses efeitos relacionados ao aumento da plasticidade neuronal e à redução de processos inflamatórios. Dessa forma, espera-se que os animais idosos submetidos ao enriquecimento ambiental apresentem melhor desempenho nas tarefas de aprendizagem associativa e reconhecimento de objetos quando comparados aos respectivos controles18.

Em relação à atividade física, espera-se que os animais submetidos ao exercício apresentem melhora do desempenho cognitivo, especialmente nas tarefas relacionadas à aprendizagem e à memória. Essa hipótese é sustentada por evidências recentes de que o exercício pode atenuar o declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento por mecanismos associados à neuroplasticidade, neurogênese hipocampal e aumento de fatores neurotróficos. Em ratos naturalmente envelhecidos, por exemplo, diferentes modalidades de exercício foram associadas à melhora da aprendizagem espacial e à ativação de mecanismos relacionados à neurogênese e à autofagia hipocampal19.

Também é possível que os efeitos das intervenções sejam observados nos ritmos de atividade e repouso. O envelhecimento está associado à redução da amplitude e à maior fragmentação dos ritmos circadianos, o que pode comprometer a organização temporal dos comportamentos. Nesse sentido, espera-se que o enriquecimento ambiental e, principalmente, a atividade física contribuam para uma maior estabilidade e organização do ritmo de atividade locomotora dos animais idosos. Essa possibilidade é particularmente relevante, considerando que o protocolo prevê o monitoramento contínuo da atividade locomotora durante 24 horas e a análise dos parâmetros

circadianos. Evidências recentes também indicam uma relação entre atividade física e manutenção de ritmos circadianos mais robustos durante o envelhecimento20.

Quanto às análises neuroquímicas, espera-se que as intervenções promovam alterações compatíveis com um estado de maior plasticidade e menor impacto das alterações relacionadas ao envelhecimento. O protocolo prevê a avaliação de GFAP e IBA1 como marcadores relacionados à resposta glial, além de BDNF e NeuN como indicadores associados à plasticidade e integridade neuronal. Assim, uma possibilidade é que os animais idosos submetidos às intervenções apresentem aumento da sinalização relacionada à plasticidade neuronal, particularmente de BDNF, acompanhado de alterações na resposta astroglial e microglial. A literatura recente relaciona os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o cérebro à modulação da expressão de BDNF e de mecanismos envolvidos na plasticidade neuronal21.

Por fim, espera-se que a combinação entre atividade física e enriquecimento ambiental produza efeitos mais amplos sobre os diferentes domínios avaliados, uma vez que as duas intervenções podem atuar por mecanismos parcialmente distintos e complementares. Estudos experimentais recentes demonstram que a associação entre exercício e enriquecimento ambiental pode produzir benefícios cognitivos superiores aos observados com intervenções isoladas, embora esse efeito não necessariamente ocorra para todos os parâmetros avaliados22. Dessa maneira, os resultados futuros poderão contribuir para determinar não apenas se essas estratégias são capazes de atenuar os efeitos do envelhecimento, mas também qual intervenção apresenta maior eficácia, em qual período da vida e após quanto tempo de exposição, além de esclarecer se a combinação das intervenções promove benefícios adicionais. Esses achados poderão ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na resiliência cerebral durante o envelhecimento e fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias não farmacológicas voltadas à preservação da cognição e da organização temporal do organismo.

Conclusão

O presente estudo busca ampliar a compreensão dos efeitos do enriquecimento ambiental e da atividade física sobre as alterações cognitivas, comportamentais e neurobiológicas associadas ao envelhecimento. A avaliação conjunta do desempenho cognitivo, dos ritmos de atividade e repouso e de marcadores de plasticidade e resposta glial permitirá identificar possíveis mecanismos relacionados à resiliência cerebral. Espera-se que os resultados contribuam para esclarecer a eficácia dessas intervenções em diferentes períodos de exposição e verificar se sua combinação promove benefícios adicionais. Dessa forma, o estudo poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias não farmacológicas destinadas à preservação da cognição e da organização temporal durante o envelhecimento.

Referências

Bwiza, C., Son, J., & Lee, C. (2019, July 29). Integrated Theories of Biological Aging. Oxford Research Encyclopedia of Psychology. Retrieved 26 Aug.2023, https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190236557.013.334Teixeira, I. N. D., & Guariento, M. E. (2010). Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. Ciência & Saúde Coletiva, 15, 2845-2857. https://doi.org/10.1590/S1413-81232010000600022 Alves, C. A. D. N. (2014). Envelhecimento e longevidade na modernidade técnica: os desafios do prolongamento da vida. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE. https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/6337/1/CRISTINA_ALESXANDRA_NASCIMENTO_ALVES.pdfDe Moraes, E. N., De Moraes, F. L., & Lima, S. D. P. P. (2010). Características biológicas e psicológicas do envelhecimento. Rev Med Minas Gerais, 20(1), 67-73. http://www.observatorionacionaldoidoso.fiocruz.br/biblioteca/_artigos/197.pdf Glisky EL. Alterações na Função Cognitiva no Envelhecimento Humano. In: Riddle DR, editor. Envelhecimento Cerebral: Modelos, Métodos e Mecanismos. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Capítulo 1. Disponível em: https://www-ncbi-nlm-nih.ez18.periodicos.capes.gov.br/books/NBK3885/Castro, B. D. (2020). Aprimoramento cognitivo e a produção de modos de subjetividade: um estudo sobre o uso de substâncias “nootrópicas” a partir de um blog brasileiro. Saúde e Sociedade, 29(1), e190936. https://doi.org/10.1590/S0104-12902020190936 Ali, S., Liu, X., Queen, N. J., Patel, R. S., Wilkins, R. K., Mo, X., & Cao, L. (2019). Longterm environmental enrichment affects microglial morphology in middle age mice. Aging (Albany NY), 11(8), 2388. https://doi.org/10.18632/aging.101923Birch, A. M., & Kelly, Á. M. (2019). Lifelong environmental enrichment in the absence of exercise protects the brain from age-related cognitive decline. Neuropharmacology, 145, 59- 74. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.042 Balietti, M., Pugliese, A., Fabbietti, P., Di Rosa, M., & Conti, F. (2019). Aged rats with different performances at environmental enrichment onset display different modulation of habituation and aversive memory. Neurobiology of Learning and Memory, 161, 83-91. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.04.001 Silva-Almeida, C., Muniz, S. C. A., Jobim, C. M. N., Laureano-Melo, R., Lau, R. S., Costa,C. R. M., ... & Rocha, F. F. (2024). Perinatal environmental enrichment changes anxiety-like behaviours in mice and produces similar intergenerational benefits in offspring. Behavioural Brain Research, 456, 114700. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114700 Harland, B. C., & Dalrymple-Alford, J. C. (2020). Enriched environment procedures for rodents: creating a standardized protocol for diverse enrichment to improve consistency across research studies. Bio-protocol, 10(11), e3637-e3637. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3637 Frith, E., & van Praag, H. (2017). Exercise and the aging brain. Current Opinion in Neurobiology, 40, 145-152 Wang, J., & Wang, X. (2016). Exercise and memory: A systematic review. Neural Plasticity, 2016, 1-10. Cassilhas, R. C., Lee, K. S., & Tufik, S. (2016). Physical exercise, neuroplasticity and the elderly. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 22(4), 346-350.Duzel, E., van Praag, H., & Sendtner, M. (2016). The aging hippocampus and the benefits of exercise. Frontiers in Neuroscience, 10, 337.Morris, J. K., & Twig, G. (2017). Exercise and cognitive function in Alzheimer's disease. Current Alzheimer Research, 14(7), 743-750.Ludyga, S., & Wolf, S. (2016). Effects of acute exercise on cognitive function in children and adolescents. Journal of Sport and Health Science, 5(2), 170-178.Mohd Sahini, S. N., Mohd Nor Hazalin, N. A., Srikumar, B. N., Jayasingh Chellammal, H. S., & Surindar Singh, G. K. (2024).

Environmental enrichment improves cognitive function, learning, memory and anxiety-related behaviours in rodent models of dementia: Implications for future study. Neurobiology of learning and memory, 208, 107880. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2023.107880Caruso, M. G., Nicolas, S., Lucassen, P. J., Mul, J. D., O'Leary, O. F., & Nolan, Y. M. (2024). Ageing, Cognitive Decline, and Effects of Physical Exercise: Complexities, and Considerations from Animal Models. Brain plasticity (Amsterdam, Netherlands), 9(1-2), 43–73. https://doi.org/10.3233/BPL-230157Fairof, M. H. Z., Abdul Karim, N., Ooi, T. C., Lew, L. C., Ludin, A. F. M., & Rajab, N. F. (2026). Mapping the effects of exercise on cognition and physical function: a scoping review of rodent studies. Frontiers in physiology, 17, 1769763.Cutuli, D., Landolfo, E., Petrosini, L., & Gelfo, F. (2022). Environmental Enrichment Effects on the Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Healthy Condition, Alzheimer's Disease, and Other Neurodegenerative Disorders. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 85(3), 975–992.Saheb, M., Khodadadegan, M. A., Sahab Negah, S., Saburi, E., & Hajali, V. (2023). Effect of a combined program of running exercise and environmental enrichment on memory function and neurogenesis markers in amyloid-beta-induced Alzheimer-like model. Iranian journal of basic medical sciences, 26(12), 1400–1408.

CÓDIGO: HS1257

AUTOR: PEDRO LUCAS SOARES COSTA

ORIENTADOR: MAGNOLIA FERNANDES FLORENCIO DE ARAUJO

TÍTULO: Ensino de Ciências e Sustentabilidade: importância dos espaços não escolares na literacia científica

Resumo

Este trabalho investiga o papel dos espaços educativos não escolares na promoção da literacia científica e da educação para a sustentabilidade, fundamentando-se na abordagem CTSA (Ciência, Tecnologia, Sociedade e Ambiente) e no Ensino por Investigação. A pesquisa, de natureza qualitativa e quantitativa, utilizou questionários, entrevistas e observação participante com professores, estudantes da educação básica e visitantes no Parque das Ciências da UFRN, em Natal-RN. O espaço conta com exposições imersivas, como o Jardim Sensorial e a Horta do Museu, que traduzem conceitos científicos abstratos em experiências práticas. A análise dos dados demográficos e de percepção do público revelou expressiva eficácia na comunicação científica e na construção de novos conhecimentos. Ademais, o parque atua como ambiente de formação inicial de professores, fortalecendo a relação universidade-comunidade e fomentando práticas de ciência cidadã e aberta.

Palavras-chave: Ensino de Ciências; Sustentabilidade; Espaços Não Escolares

TITLE: Science Education and Sustainability: The Importance of Non-Formal Learning Spaces in Scientific Literacy

Abstract

This study investigates the role of non-formal educational spaces in promoting scientific literacy and education for sustainability, grounded in the CTSA (Science, Technology, Society, and Environment) approach and Inquiry-Based Teaching. Using a combined qualitative and quantitative approach, data were collected through questionnaires, interviews, and participant observation involving teachers, basic education students, and visitors at the UFRN Science Park in Natal, RN. The park features immersive exhibits, such as the Sensory Garden and the Museum Garden, which translate abstract scientific concepts into practical experiences. Data analysis on visitor demographics and perception demonstrated significant effectiveness in science communication and knowledge building. Furthermore, the space serves as an initial teacher training ground, strengthening university-community ties and promoting citizen and open science initiatives.

Keywords: Science Education; Sustainability; Non-Formal Spaces

Introdução

Um dos grandes desafios mundiais da contemporaneidade é conviver em harmonia exercendo uma cidadania democrática, ativa e responsável, especialmente em países latino-americanos. Diante desse cenário de profunda crise planetária, pesquisadores e educadores em ensino de ciências têm enfatizado a urgência de uma educação científica de qualidade, inclusiva e acessível (Araújo, 2025)

Uma forma de contribuir para a mudança dessa realidade é repensar e recriar modelos formativos de educação que priorizem a educação CTSA (ou seja, baseada na Ciência, Tecnologia, Sociedade e Ambiente), a partir de questões sociocientíficas e socioambientais. No âmbito da educação CTSA, essas controvérsias caracterizam-se pela discussão de problemas comuns da atualidade que são multifacetados e repletos de conflitos de interesse, perpassando valores éticos, morais, políticos, econômicos e históricos (Araújo, 2025)

A formação de professores baseada em Questões socioambientais e científicas possibilita um posicionamento sobre estas questões, favorecendo o desenvolvimento de capacidades cidadãs críticas que permitam avançar no desenvolvimento de uma sociedade mais democrática e justa (Barragán & Martinez, 2022), Também favorece uma formação cidadã que garanta a compreensão pública das grandes questões ambientais e suas implicações na sociedade, para promover a tomada de decisões e ações sociais responsáveis (Martinez, 2022).

A introdução da chamada ciência cidadã, uma parceria entre comunidades e os pesquisadores para a coleta de dados, utiliza metodologias participativas ou de colaboração para ampliar a contribuição do público para questões ambientais e de saúde na gestão ambiental. Os estudos participativos dentro da perspectiva da Ciência cidadã podem desempenhar um papel essencial nesse contexto, pois implicam uma compreensão mais profunda do processo científico. Nesta proposta, sob a ótica da Ciência cidadã, a qual se apoia em um novo paradigma em que a investigação é enquadrada em uma questão relevante identificada pelos cidadãos, novas aprendizagens emergem dos diferentes campos de conhecimentos colocados em diálogo.

Assim, sabendo da importância na divulgação e engajamento de iniciativas em prol da conservação ambiental, em especial de ambientes verdes em regiões urbanas, esse trabalho pretendeu trabalhar junto a professores e alunos de escolas básicas e a população que frequenta espaços educativos não escolares, levando-os a observar e anotar dados que serão analisados na pesquisa. Isto concorre para a promoção de outro aspecto inovador - a ciência aberta, uma vez que parte dos dados coletados serão publicizados, possibilitando sua reutilização por outros projetos de pesquisa e pelas populações em geral (Araújo, 2025)

Metodologia

Os principais temas socioambientais contemplados nesta proposta serão: Mudanças Climáticas, Perda de Biodiversidade, Justiça Ambiental, Agricultura Sustentável, Saúde e sustentabilidade dos solos, ensino de ciências na socioeducação e em espaços verdes. Sujeitos da pesquisa:Foram envolvidos estudantes e professores de escolas públicas do Norte/Nordeste brasileiro (RN, Piauí e Pará). Os estudos também preveem a participação do público em geral nos espaços não escolares integrantes.

As práticas educativas e atividades de divulgação serão vivenciadas pelos estudantes, professores e público em geral em diferentes espaços de aprendizagem (formais e não formais de ensino), destacando-se, como espaços não escolares, o Parque das ciências na UFRN e o Museu de Ciências Naturais da Cidade das outras cidades/instituições integrantes.

Instrumentos de coleta de dados e análises
As pesquisas aqui integradas têm abordagem qualitativa e quantitativa, podendo-se caracterizar como pesquisa de campo com coletas de dados que acontecerão por meio de diversos instrumentos como questionários, entrevistas e observação participante, dentre outras possibilidades a serem incorporadas incluindo o apoio prático da ciência cidadã. Os registros qualitativos serão interpretados e analisados por meio da análise de conteúdo (Bardin, 2009). A pesquisa de campo é um estudo de natureza descritiva explicativa.

Buscou-se coletar os dados diretamente com os participantes da pesquisa, por meio de questionários e observações diretas. Este tipo de entrevista não segue um padrão, pois o pesquisador elabora um roteiro com uma lista de questões em que algumas podem não ser usadas. Dependendo do direcionamento da entrevista outras questões podem ser adicionadas no roteiro, inclusive algumas que não tenham sido inicialmente previstas (Gray, 2012).

O questionário, como ferramenta de coleta de dados, foi definido como uma técnica de investigação constituída por questões que são submetidas a determinado público que forneceu informações sobre conhecimentos, percepções, crenças, sentimentos, aspirações e interesses, dentre outros (Gil, 2008), estando entre os instrumentos de pesquisa mais utilizados. Ele poderá ser restrito, pedindo respostas curtas, ou sugere as respostas a serem marcadas, e o segundo grupo, chamado de aberto, tem questões que permitem os respondentes escreverem suas opiniões e percepções. Ele também pode ser misto, por conter perguntas abertas e fechadas (Rosa, 2013).

Para a coleta de dados durante as atividades educativas, foram realizadas observações in loco e observação participante. Segundo Marconi e Lakatos (2004), a observação implica na interação dos pesquisadores com os grupos sociais na busca de coletar os contextos ou a situação específica do grupo. Adotando esse modelo de coleta de dados, o pesquisador vislumbra executar uma estratégia de campo que combina a participação ativa com os sujeitos. A observação participante se configura como uma técnica em que o pesquisador emerge no campo empírico com a finalidade de compreender a realidade dos sujeitos e como se constroem suas realidades.

O desenvolvimento das propostas de intervenções se deu nos diversos espaços disponíveis e estarão ancoradas na abordagem CTSA e Ensino por Investigação,

abordagens que interagem e se complementam entre si. Foram selecionados conteúdos com temas das ciências relacionadas à sustentabilidade e questões ambientais amplas.

Resultados e Discussões

Público visitante

A pesquisa foi realizada no Parque das Ciências da UFRN, uma área verde localizada no coração do Tirol em Natal – RN, essa área verde pertence ao Museu Câmara Cascudo da UFRN. O parque funciona como um laboratório a céu aberto com diversas exposições, como o Jardim sensorial e a Horta do museu. O espaço trabalha com a divulgação científica e a inclusão, com temáticas voltadas à educação para a sustentabilidade. Além do Jardim e Horta, o parque também possui a Sala de Energia e Vida que conecta conceitos de energia no nosso dia a dia a ações sustentáveis que podemos tomar, além da conscientização sobre como a energia que nós usamos chega até nós, e os impactos causados por isso. O parque também possui a Sala de Atividades práticas que fala sobre conceitos importantes que envolvem nossa vida como pH, fluorescência, descarte de químicos entre outros.

A utilização do Parque como espaço de formação inicial para os professores permite que os licenciandos vivenciarem a interdisciplinaridade na prática, envolvendo contato direto com diversos públicos, dessa forma eles são desafiados a organizar atividades e simplificar conceitos científicos complexos para o público geral, estimulando a própria alfabetização científica e contribuindo para a alfabetização dos alunos e visitantes que vão até o parque.

Além disso, o Parque também fomenta a ciência cidadã e a ciência aberta, pois possui atividades itinerantes que conectam diretamente a universidade a essas comunidades da capital e do interior (Nascimento, 2025). Essa abordagem itinerante proporciona a universidade e a comunidade uma troca de saberes entre alunos, professores e pesquisadores, proporcionando trocas e melhorias ambientais reais para o estado (Nascimento, 2025).

Os jardins Sensoriais, jardins comunitários, hortas e outros espaços de visitação desempenham um papel fundamental na pesquisa, gerando cenários para a alfabetização e literacia científica, proporcionando aos envolvidos (alunos, professores, visitantes) uma abordagem “imersiva” no ensino de ciências, através de atividades práticas realizadas nesses espaços, como as atividades do Jardim Sensorial que envolvem contato direto com as plantas, suas formas, texturas e cheiros.

Além disso, a pesquisa nos mostrou que a saúde e sustentabilidade dos solos são eixos que integram essas discussões, pois o solo desempenha funções ecológicas vitais para a manutenção da vida no planeta, como filtragem e armazenamento de água, produção de alimentos, sustentação e atua como um aprisionador de carbono. Portanto, através de

abordagens investigativas os alunos conseguem relacionar a qualidade dos solos com a sustentabilidade, medindo isso através da qualidade de vida social e o desenvolvimento das suas comunidades como um todo de forma sustentável.

A análise dos dados da pesquisa de opinião realizada com os usuários sobre as exposições revelou aspectos de ambos os tipos, qualitativos e quantitativos, dados estes que revelam sobre a eficácia da comunicação científica em espaços não escolares. Inicialmente temos o perfil demográfico dos participantes, onde o gênero dominante é o feminino com 60% de respostas aos questionários, seguido do masculino que compõe 40% dos dados. A faixa etária variou de 19 a 50 anos, sendo que a faixa de 19 anos a 29 anos foi a parcela mais expressiva do questionário com 42 respostas, seguido da faixa de 30 a 39 anos com 31 respostas, 40 a 49 anos com 27 respostas e por fim 50+ com 15 respostas. A maioria do público possui pós-graduação, correspondendo a 53 pessoas, 28 com ensino superior completo e 25 com ensino superior incompleto/em andamento, por fim apenas 9 pessoas responderam que possuíam apenas o ensino médio ou fundamental.

Tivemos seções divididas iniciando pela “Clareza da explicação dada” a grande maioria das respostas indica que os visitantes entenderam completamente ou parcialmente as exposições, com 56% concordando totalmente e 44% concordando parcialmente. Na seção “Identificação do tema proposto” 60% dos visitantes concordaram totalmente que conseguiram entender o tema e 22% concordaram parcialmente. Na seção “Impacto e percepção” os visitantes deveriam indicar se aprenderam algo novo ou construíram uma nova perspectiva sobre o tema proposto após a visita, 60% dos visitantes concordaram totalmente e 27% concordaram parcialmente.

No aspecto qualitativo os visitantes indicaram que apesar de terem conseguido aproveitar a experiência e entender o tema proposto, alguns pontos sobre melhorias foram levantados, como a inserção de textos explicativos nas exposições e maior contextualização dos locais que são citados durante as mediações, para que o público que não conhece determinados espaços se sinta incluído, além disso também sugeriram uma maior clareza acerca dos sinais visuais das exposições, como sugestões para adicionar o nome dos peixes na projeção.

O Jardim Sensorial também foi avaliado durante esta pesquisa, mais precisamente o uso dele como recurso didático no ensino de ciências, a análise se deu a partir da observação dos participantes durante sua passagem no jardim. A análise mostrou que a experiência multissensorial do jardim atuou como um mecanismo de imersão para o aluno, trazendo ao cotidiano dele a conexão com a natureza, suas formas, tamanhos e cheiros. Essa imersão atua diretamente contra a invisibilidade botânica, pois leva o aluno a interagir diretamente com as plantas em busca de realizar a atividade proposta.

Aliado aos espaços do parque, como o terrário, sala de energias, sala de atividades práticas e o banco musical, o Jardim Sensorial deixa de ser apenas uma área verde (primeira impressão) e passa a ser também um espaço que integra atividades e experiências de aprendizagem, unindo o cognitivo e o afetivo do aluno ao estimular seu contato com a natureza.

Portanto, a interação direta dos visitantes com as exposições do parque como o Jardim Sensorial, a Horta do Museu e as Salas expositivas, trazem uma aproximação real do

indivíduo aos conhecimentos científicos, traduzindo conceitos anteriormente abstratos a experiências sensoriais e visuais concretas, que trazem a teoria da sala de aula para o dia a dia do aluno.

Ao envolver estudantes e professores da educação básica, o projeto fortalece os laços da universidade com a comunidade, estimulando a troca de saberes entre os indivíduos envolvidos e superando o modelo unidirecional de conhecimento (a universidade apenas com o papel de ensinar).

Conclusão

Conclui-se apontando a importância de espaços como o Parque das Ciências como espaços eficazes para a divulgação científica e democratização do conhecimento a partir dos seus recursos didáticos, são instrumentos plenamente capazes de desenvolver a alfabetização científica e promover a educação para a sustentabilidade por meio do ensino de ciências. Ao alinhar as atividades práticas aos ODS's são estimulados valores éticos sobre os impactos coletivos e individuais no mundo e incentivam o pensamento crítico e cidadão, contribuindo para a conservação ambiental.

Além disso, o uso de espaços não escolares por parte dos professores em formação contribui para o fortalecimento da identidade profissional desses futuros professores, enquanto alternam entre teoria e prática eles se tornam capazes de promover uma educação com foco em CTSA, trazendo o ensino para mais perto do aluno e abrindo novos caminhos para a divulgação científica dentro das escolas.

Referências

ARAÚJO, A. O. Saúde e sustentabilidade dos solos no ensino de ciências: uma proposta didática utilizando a abordagem do ensino por investigação. 2025. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências Naturais e Matemática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio de (org.). Ensinando Ciências no Parque: educação para a sustentabilidade e inclusão em espaço não escolar. Natal: EDUFRN, 2025.

BARDIN, L. Análise de conteúdo. Lisboa (Portugal): Edições, v. 70, p. 225, 2010.
CARVALHO, A. M. P. de. Fundamentos teóricos e metodológicos do ensino por investigação. Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências, p. 765-794, 2018
CIMEIRA MUNDIAL DOS CENTROS DE CIÊNCIA. Protocolo de Tóquio. Tóquio, 2017.
GIL-PÉREZ, D.; VILCHES, A.; GONZÁLEZ, M. Museos para la glocalidad: una

propuesta de museo que ayude a analizar los problemas de una región. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias, v. 1, n. 2, p. 87-102, 2004.

NASCIMENTO, Aline Gadelha do. Jardins sensoriais como espaços de inclusão e formação científica na perspectiva da educação para a sustentabilidade. Orientadora: Dra. Magnólia Fernandes Florêncio de Araújo. 2025. 136f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

CÓDIGO: HS1271

AUTOR: SARAH KAROLINE CARNEIRO SILVA

COAUTOR: JANE CARLA DE SOUZA

ORIENTADOR: CAROLINA VIRGINIA MACEDO DE AZEVEDO

TÍTULO: Relação do jetlag social e débito de sono com o desempenho atencional em adolescentes do turno matutino

Resumo

A adolescência é caracterizada pelo atraso nos horários de dormir e acordar. Para cumprir os horários escolares matutinos, os estudantes reduzem a duração do sono na semana, resultando em sono insuficiente, irregularidade nos horários e sonolência diurna excessiva, levando a prejuízos na atenção. Com o objetivo de avaliar a relação do jetlag social (JLS) e débito de sono com o desempenho atencional, foram estudados 129 adolescentes (15,7±0,9 anos) de ambos os sexos (90 meninas/39 meninos), do ensino médio no turno matutino. Os participantes responderam aos questionários “A Saúde e o Sono”, “Questionário de Cronotipo de Munique”e “Escala Pediátrica de Sonolência”, além do Diário de Sono por 10 dias. A avaliação da atenção foi realizada pela Tarefa de Execução Contínua entre 7h30 e 9h. As análises por correlação de Spearman apontaram que quanto maior o JLS, maior a tendência à vespertinidade ($r=0.647$, $p<0,01$), e maior o débito de sono ($r=0.278$,$p<0,1$). Além disso, quanto maior o débito de sono, maior a sonolência diurna ($r=0.346$,$p<0,01$) e menor o percentual de respostas corretas no alerta fásico ($r=-0,182$,$p>0,05$) e atenção sustentada ($r=-0,192$,$p>0,05$). Enquanto no alerta tônico ($r=0,182$,$p>0,05$) e atenção seletiva ($r=0.200$,$p>0,05$), a maior sonolência foi associada a maior tempo de reação. Sugere-se que há relação entre o débito de sono e a sonolência diurna, assim como com prejuízos no desempenho atencional, podendo afetar negativamente a aprendizagem e o desempenho escolar.

Palavras-chave: Atenção. Ciclo sono-vigília. Adolescência. Duração do sono.

TITLE: The Relationship Between Social Jet Lag and Sleep Deprivation and Attention Performance in Adolescents in the Morning Shift

Abstract

Adolescence is characterized by a shift toward later bedtimes and wake-up times. To meet morning school schedules, students reduce their sleep duration during the week, resulting in insufficient sleep, irregular schedules, and excessive daytime sleepiness, which leads to impaired attention. To evaluate the relationship of social jetlag (SJL) and sleep debt with attentional performance, 129 adolescents (15.7 ± 0.9 years old) of both sexes (90 girls/39 boys) attending morning-shift high school classes were studied. Participants completed the "Health and Sleep" questionnaire, the "Munich Chronotype Questionnaire," and the "Pediatric Daytime Sleepiness Scale," in addition to keeping a sleep diary for 10 days. Attention was assessed using the Continuous Performance Task between 7:30 AM and 9:00 AM. Spearman correlation analyses indicated that higher SJL was associated with a greater tendency toward eveningness ($r=0.647$, $p<0.01$) and greater sleep debt ($r=0.278$, $p<0.1$). Furthermore, higher sleep debt was associated with greater daytime sleepiness ($r=0.346$, $p<0.01$) and a lower percentage of correct responses in tasks measuring phasic alertness ($r=-0.182$, $p>0.05$) and sustained attention ($r=-0.192$, $p>0.05$). Regarding tonic alertness ($r=0.182$, $p>0.05$) and selective attention ($r=0.200$, $p>0.05$), higher sleepiness was associated with longer reaction times. The findings suggest a relationship between sleep debt and daytime sleepiness, as well as impairments in attentional performance.

Keywords: Attention. Sleep-wake cycle. Adolescence. Sleep duration.

Introdução

O padrão de sono é individual e difere nas diferentes fases da vida. Na adolescência, observamos uma fase de maior independência e surgimento de novos papéis sociais, que afetam o comportamento, incluindo o sono. Nessa área, a busca por autonomia se manifesta na decisão de quando dormir (Carskadon, 2011). Impulsionados em parte por essa autonomia recém-adquirida, combinada com atrasos de fase no ciclo de sono e vigília, além de alterações no sistema homeostático regulador do sono que proporcionam maior tolerância à pressão do sono (Jenni, Oskar G et al., 2005), os horários de dormir tornam-se mais tardios a cada ano que passa durante a adolescência (Carskadon et al., 1993; Andrade et al., 1993). Os horários de despertar, por outro lado, são mais frequentemente determinados pelos horários de início das aulas, e portanto, são geralmente antecipados. Consequentemente, observa-se que os adolescentes têm se apresentado cada vez mais sonolentos e desatentos em sala de aula. Um dos possíveis motivos para esses acontecimentos é o horário do início das aulas pela manhã, que tende a encurtar a duração do sono dos adolescentes, deixando-os privados de sono e sonolentos nos horários matutinos, levando até mesmo a ocorrência de cochilos durante as aulas (Wahlstrom, 2014; Owens, 2010). Diante desse cenário, os adolescentes tendem a compensar a privação de sono acumulada durante os dias letivos estendendo sua duração nos finais de semana, em um padrão de restrição e extensão do sono (Andrade et al., 1993; Carskadon et al., 1993) mensurável pelo débito de sono (diferença na duração do sono entre dias úteis e livres). Paralelo a isso, este conflito temporal entre os padrões de sono e o horário de início das aulas pela manhã leva a um padrão temporal de sono irregular entre os dias de aula e livres (Peixoto et al. 2009; Tarokh, 2016; Exelmans 2017; Crowley, 2018). Esse descompasso entre os ritmos endógenos e as exigências sociais caracteriza o quadro conhecido como jetlag social (Wittmann et al., 2006). Ademais, a lista de consequências negativas associadas à uma privação de sono é extensa e inclui sonolência e alterações de humor, desatenção, baixo rendimento escolar, problemas de

comportamento, uso e abuso de substâncias, acidentes de trânsito, sobrepeso e comprometimento do sistema imunológico.

Metodologia

Nessa amostra transversal, os dados foram retirados de um banco de dados de coletas realizadas entre os anos de 2019 e 2025 em quatro instituições públicas de ensino médio em Natal/RN, com estudantes dos primeiros e segundos anos, no turno matutino. Antes de qualquer interação com os alunos, houve uma conversa com a direção, equipe pedagógica e professores das escolas para a apresentação do projeto e a discussão sobre a programação da execução da pesquisa na escola. A partir do consentimento e aprovação do corpo pedagógico, os estudantes foram recrutados através de convites feitos em sala de aula de forma presencial. Aos interessados em participar, foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelo responsável, e o Termo de Assentimento assinado pelos próprios alunos.Esses alunos também colocaram nome e número de celular em uma lista, e através disso, foi mantido contato com eles para o envio dos questionários e diários de sono, além de serem marcados os horários para se realizar a tarefa de atenção. Foram incluídos na amostra adolescentes de ambos os sexos, que estejam matriculados no turno matutino do ensino médio em escolas públicas do Rio Grande do Norte, que voluntariamente entregarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídos adolescentes que relatem: 1) uso regular de psicofármacos; 2) distúrbios de sono e de saúde; 3) diagnóstico de distúrbios neurológicos (p.ex. epilepsia) atuais ou no passado, deficiências sensoriais e/ou motoras sérias, e déficits cognitivos; 4) diagnóstico de uma das seguintes doenças psiquiátricas: Depressão Maior, Transtorno do Humor Bipolar, Transtorno Psicótico, Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH); e 5) que não preencham os questionários por completo. Para a coleta de dados, os participantes preencheram um total de quatro questionários de aplicação única, disponibilizados de forma online, sendo eles: (1) A Saúde e o Sono, o (2) Questionário de Cronotipo de Munique, o (3) Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh e (4) Escala Pediátrica de Sonolência. Já para avaliar os componentes atencionais foi utilizada a TEC (Tarefa de Execução Contínua). Em relação aos instrumentos:

O questionário “A Saúde e o Sono” utilizado foi a versão modificada por Mathias et al. (2006), que contém questões sobre saúde geral, hábitos de sono do indivíduo e condições socioeconômicas.

O Questionário de Cronotipo de Munique foi desenvolvido para avaliar o cronotipo baseado na fase de sono de cada indivíduo (Roenneberg et al. 2003b). Esse instrumento tem questões sobre os hábitos de sono, separando os dias livres dos dias de semana. O cronotipo é baseado no ponto médio do sono nos dias livres, momento em que não há obrigações escolares.

O Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh, desenvolvido por Buysse et al. (1989) e validado para o português por Bertolazi et al. (2011), foi utilizado para avaliar a qualidade subjetiva do sono dos participantes no último mês. O instrumento é composto por questões subjetivas, que geram pontuações em sete componentes: qualidade subjetiva do sono, latência para adormecer, duração do sono, eficiência habitual do sono, distúrbios

do sono, uso de medicamentos para dormir e sonolência diurna. O escore total varia de 0 a 21, sendo que pontuação maior que 5 indica má qualidade do sono (SWANN et al., 2018).

A Escala Pediátrica de Sonolência Diurna é composta de 8 questões em que crianças e adolescentes avaliam os níveis de sonolência diurna em situações cotidianas, tais como em sala de aula ou fazendo uma lição de casa. Em cada questão o participante tem cinco opções para a ocorrência de sonolência entre "nunca" a "sempre". A pontuação total varia entre 0 e 32 pontos, com os maiores escores indicando maiores níveis de sonolência.

A Tarefa de Execução Contínua, elaborada por Valdez, et al. (2005), consiste em uma atividade realizada através da tela de um computador com duração de cerca de 11 minutos e apresentação de 540 estímulos, objetivando avaliar os quatro componentes da atenção (alerta tônico, alerta fásico, atenção seletiva e atenção sustentada). Para aplicação da tarefa, o aluno foi retirado da sala de aula entre às 7:30h e 9:30h para outra sala, no qual foi realizado um treino para evitar efeitos de aprendizagem no desempenho. A atividade consiste na exibição de números de 0 a 9 de forma aleatória, nos quais, os participantes têm que pressionar o número "1" quando aparecer qualquer número exceto "9", pressionar o número "2" se aparecer o " 9", e pressionar o número "3" se depois do "9" aparecer o "4", mas se aparecer um número diferente de "4" depois de "9" se deve pressionar o número "1".As respostas diante dos números de 0 a 8 são indicativos de alerta tônica, as respostas diante do "9" são indicadores de atenção seletiva, as respostas diante do número "4" depois do "9" são indicadoras de alerta fásico e a atenção sustentada é avaliado pela capacidade do participante em manter a concentração ao longo de toda a tarefa.

Resultados e Discussões

O cronotipo se relacionou positivamente de maneira forte com o jetlag social ($r=0.647$, $p<0,001$), porém não se relacionou com o débito de sono ($r=-0.071$, $p=0.423$) e a sonolência diurna ($r=-0.037$,$p=0.675$). Diante disso, observamos que quanto maior a tendência à vespertinidade do indivíduo, maior é o jetlag social. Em uma sociedade que preza por horários matutinos, especialmente em escolas, indivíduos com cronotipos vespertinos sofrem um desalinhamento frequente entre o tempo biológico e o tempo social. Enquanto indivíduos matutinos conseguem dormir e acordar em horários próximos ao seu ideal biológico mesmo nos dias úteis, os vespertinos são forçados a acordar muito antes do seu horário biológico durante a semana. No fim de semana, eles tendem a compensar acordando e dormindo mais tarde, o que gera uma grande diferença no sono entre dias úteis e de descanso (Wittmann et al., 2006; Roenneberg et al., 2012). Enquanto a sonolência diurna e o débito de sono, são influenciados por múltiplos fatores endógenos e comportamentais como por exemplo: carga de estudos, uso de telas à noite, consumo de cafeína e qualidade do sono, que podem afetar tanto matutinos quanto vespertinos, diluindo a correlação direta com o cronotipo de maneira isolada (Pilcher et al., 1997). Observou-se também, associação positiva moderada entre o débito de sono e o jetlag social ($r=0.278$,$p<0,01$), indicando que a perda acumulada de sono que ocorre por não dormir o suficiente durante uma ou várias noites está relacionada à discrepância entre os horários de sono nos dias de aula e nos dias livres. O desalinhamento entre dormir/acordar

mais tarde, por causa do atraso natural ocorrido na adolescência, e horários de aulas muito cedo, é um dos principais fatores para o acúmulo de débito de sono e aumento do jetlag social em adolescentes (Crowley et al., 2018; Wittmann et al., 2006; Beauvalet et al., 2017). Conforme apontado por Roenneberg et al. (2012), indivíduos expostos a elevados níveis de jetlag social acumulam um débito de sono durante os dias úteis devido à impossibilidade de estender o sono matutino. Embora o prolongamento do sono nos dias livres seja uma tentativa de compensação metabólica e fisiológica, o mesmo não se mostra suficiente para anular o débito global de sono acumulado ao longo da semana (Wittmann et al., 2006). O débito de sono, se relaciona ainda, de maneira positiva e forte, com a sonolência diurna ($r=0.346, p<0,001$), indicando que os horários escolares matinais podem desempenhar um papel significativo levando a privação de sono dos adolescentes ao longo da semana (Tarokh, Leila et al., 2016) ocasionado sonolência diurna. Os resultados também demonstram uma relação negativa e fraca entre o percentual de respostas corretas no alerta fásico e a sonolência diurna ($r=-0.182, p=0.039$), no qual, quanto maior a sonolência, menor o percentual de respostas corretas para esse componente, nos mostrando que, os adolescentes, por provavelmente estarem privados de sono, vão ter a capacidade reduzida de responder a um evento após um sinal de alerta. Ainda foi observado uma correlação negativa, mesmo que fraca, entre o percentual de respostas corretas totais (atenção sustentada) e sonolência diurna ($r=-0.192, p=0.029$), o que pode ser decorrente de privação de sono, levando os adolescentes a reduzir sua capacidade de concentração ao longo da tarefa por completa. Nesses dois casos, observamos que qualquer condição que afete a eficiência desses processos, como a privação de sono, interfere no desempenho humano (Valdez, 2019), porém, os resultados também sugerem que a sonolência diurna pode afetar de forma seletiva a precisão das respostas em condições específicas, sem necessariamente impactar de maneira ampla outras dimensões da atenção como nesse caso, a atenção seletiva e o alerta tônico (Killgore, 2010; Valdez, 2019; Lo et al., 2016). A sonolência diurna ainda se relaciona fraca e negativamente com o tempo de reação para respostas do alerta tônico ($r=0.182, p=0.039$) e com o tempo de reação para respostas da atenção seletiva ($r=0.200, p=0.023$), nos mostrando que quanto mais sonolentos os estudantes estavam, maior o tempo que eles levavam para responder ao um estímulo, seja do componente de alerta tônico, seja do componente de atenção seletiva. Como o alerta tônico exige a manutenção de um estado de prontidão sem nenhum aviso prévio externo, é extremamente sensível à flutuação da pressão homeostática, ou seja, uma maior sonolência pode gerar instabilidade do estado de alerta, aumentando diretamente o tempo de reação (Garcia et al., 2021). Enquanto a atenção seletiva, está relacionada às áreas pré-frontais do cérebro, de modo que esse componente tende a diminuir após uma privação de sono, visto que o córtex pré-frontal é uma região do cérebro vulnerável à privação de sono. Nesse caso, a capacidade de detectar ativamente um estímulo específico e responder a ele por um período prolongado, é mais afetada pela privação de sono do que outros componentes, que podem se manter preservados (Garcia et al., 2021).

Conclusão

Os resultados indicam que o cronotipo está associado ao jetlag social, o jetlag está associado ao débito de sono e o débito de sono está associado à sonolência diurna. A sonolência diurna também se associa ao o percentual de respostas corretas no alerta fásico, ao o percentual de respostas corretas totais (atenção sustentada). ao tempo de

reação no alerta tônico e ao tempo de reação da atenção seletiva. Indivíduos com maior tendência à vespertinidade apresentam um maior descompasso entre os ritmos endógenos e as exigências sociais, assim como indivíduos com maior JLS apresentam maior diferença na duração do sono entre dias úteis e livres e com essa diferença eles se sentem mais sonolentos durante o dia. Essa sonolência diurna afeta de maneiras diferentes os componentes da atenção, podendo levar os alunos a errar mais ou a responder de maneira mais lenta a estímulos. Esses achados reforçam que é necessário levar em consideração o débito de sono, sonolência diurna e jetlag social para elaborar estratégias que visem melhorar a saúde e o desempenho atencional dos estudantes adolescentes.Dessa forma,pesquisas futuras com um maior número de participantes são necessárias para avaliar o impacto do cronotipo, sonolência, débito de sono e JLS diante de outras especificidades da atenção.

Referências

Andrade, M. M., Benedito-Silva, A. A., Domenice, S., Arnhold, I. J., & Menna-Barreto, L. (1993). Sleep characteristics of adolescents: a longitudinal study. Journal of Adolescent Health, 14(5), 401-406.

Castilhos Beauvalet, Juliana & Quiles, Caroline & Oliveira, Melissa & Ilgenfritz, Carlos & Hidalgo, Maria Paz & Comiran Tonon, Andre. (2017). Social jetlag in health and behavioral research: a systematic review. ChronoPhysiology and Therapy. Volume 7. 19-31. 10.2147/CPT.S108750.

Caliandro, Rocco et al. “Social Jetlag and Related Risks for Human Health: A Timely Review.” Nutrients vol. 13,12 4543. 18 Dec. 2021, doi:10.3390/nu13124543

Carskadon, M. A., Vieira, C., & Acebo, C. 1993. Association between puberty and delayed phase preference. Sleep, 16(3), 258-262.

Carskadon, Mary A. “Sleep in adolescents: the perfect storm.” Pediatric clinics of North America vol. 58,3 (2011): 637-47. doi:10.1016/j.pcl.2011.03.003.

Crowley, S. J., Wolfson, A. R., Tarokh, L., & Carskadon, M. A. (2018). An update on adolescent sleep: New evidence informing the perfect storm model. Journal of Adolescence, Vol. 67, pp. 55–65. https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2018.06.001

García, Aída et al. “Sleep deprivation effects on basic cognitive processes: which components of attention, working memory, and executive functions are more susceptible to the lack of sleep?.” Sleep science (Sao Paulo, Brazil) vol. 14,2 (2021): 107-118. doi:10.5935/1984-0063.20200049

Jenni, Oskar G et al. “Homeostatic sleep regulation in adolescents.” Sleep vol. 28,11 (2005): 1446-54. doi:10.1093/sleep/28.11.1446

Killgore, William D S. “Effects of sleep deprivation on cognition.” Progress in brain research vol. 185 (2010): 105-29. doi:10.1016/B978-0-444-53702-7.00007-5

Levandovski, Rosa Maria. Perfil cronobiológico em amostra populacional caucasiana : abordagem cronobiológica dos sintomas depressivos. Porto Alegre, 2011.

Lo., June C et al “Cognitive Performance, Sleepiness, and Mood in Partially Sleep Deprived Adolescents: The Need for Sleep Study.” Sleep vol. 39,3 687-98. 1 Mar. 2016, doi:10.5665/sleep.5552

Owens, J.A., Belon K., Moss P. Impact of delaying school start time on adolescent sleep, mood, and behavior. Arch Pediatr Adolesc Med. 2010;164(7):608–614.

Pilcher, J J et al. “Sleep quality versus sleep quantity: relationships between sleep and measures of health, well-being and sleepiness in college students.” Journal of psychosomatic research vol. 42,6 (1997): 583-96. doi:10.1016/s0022-3999(97)00004-4

Roenneberg, Till et al. “Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes.” Journal of biological rhythms vol. 18,1 (2003): 80-90. doi:10.1177/0748730402239679.

Roenneberg, Till et al. “Social jetlag and obesity.” Current biology : CB vol. 22,10 (2012): 939-43. doi:10.1016/j.cub.2012.03.038

SWANN, M. C. et al. Sleep disturbance in orthopaedic trauma patients. Journal of Orthopaedic Trauma, New York, v. 32, n. 10, p. 500-504, Oct. 2018. DOI: https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001276.

Tarokh L, Saletin JM, Carskadon MA. Sleep in adolescence: Physiology, cognition and mental health. Neurosci Biobehav Rev. 2016 Nov;70:182-188. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.08.008. Epub 2016 Aug 13. PMID: 27531236; PMCID: PMC5074885.

Valdez, P., Ramírez, C., García, A., Talamantes, J., Armijo, P., & Borrani, J. (2005). Circadian rhythms in components of attention. Biological Rhythm Research, 36(1–2), 57–65. https://doi.org/10.1080/09291010400028633

Valdez, Pablo. “Circadian Rhythms in Attention.” The Yale journal of biology and medicine vol. 92,1 81-92. 25 Mar. 2019

Wahlstrom, K., Dretzke, B., Gordon, M., Peterson, K., Edwards, K., Gdula, J. 2014. Examining the Impact of Later High School Start Times on the Health and Academic Performance of High School Students: A Multi-Site Study.

Wittmann, M., Dinich, J., Merrow, M., & Roenneberg, T. (2006). Social jetlag: misalignment of biological and social time. Chronobiology international, 23(1-2), 497–509. https://doi.org/10.1080/07420520500545979

Anexos

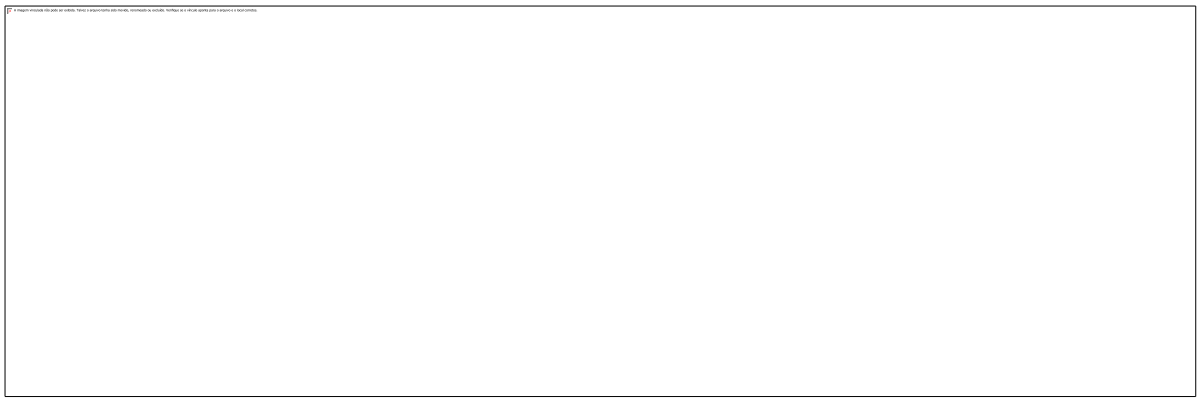


Tabela 1

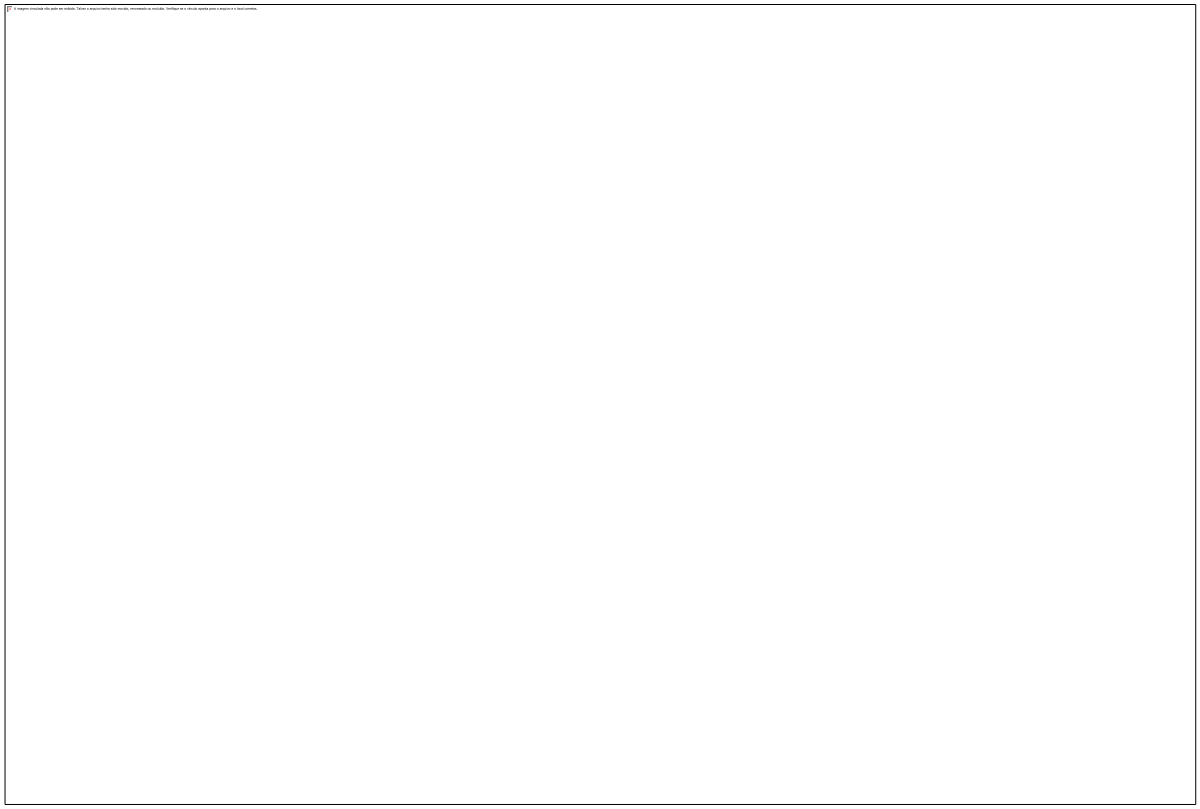
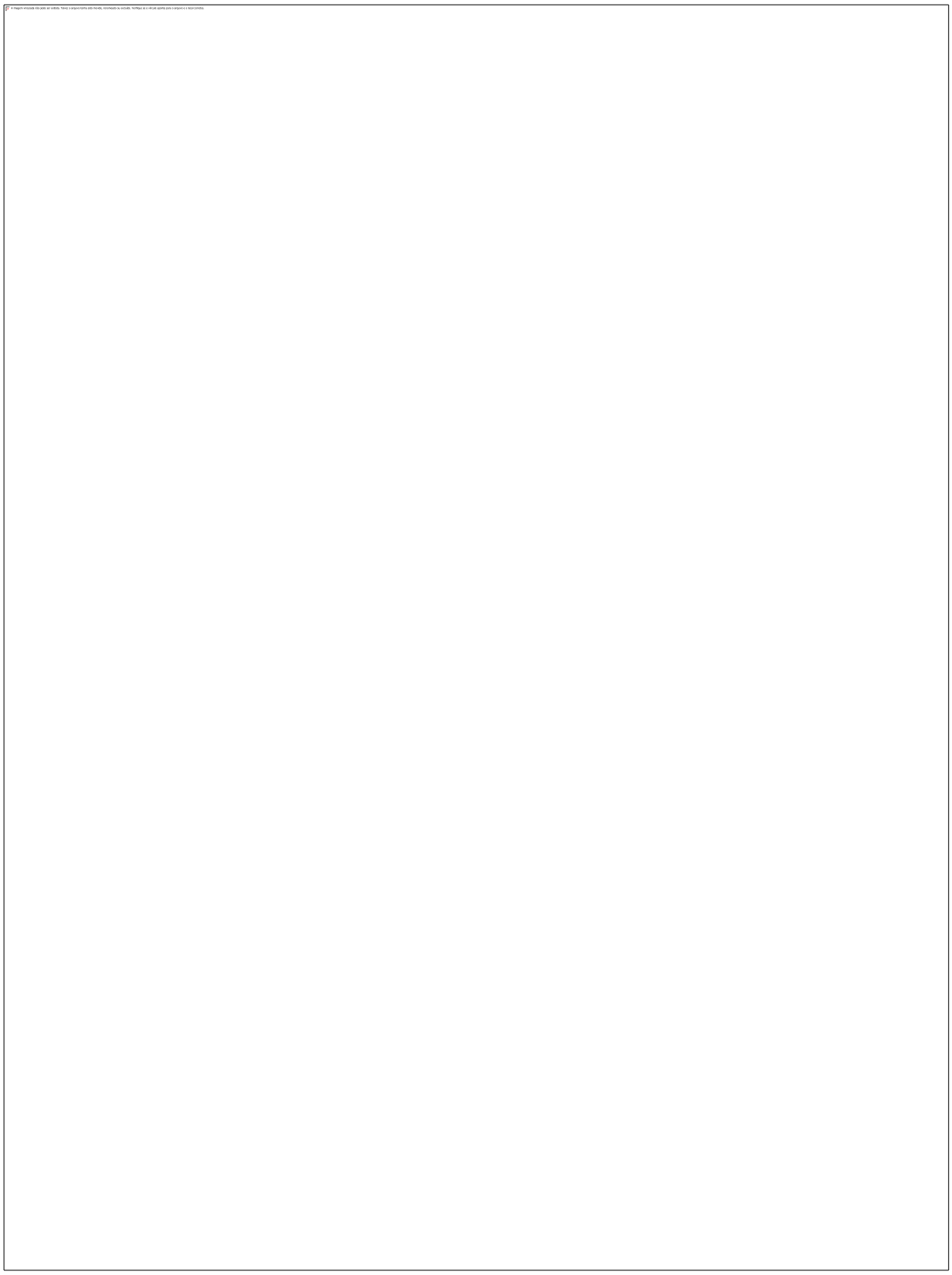


Tabela 2



Questionário "saúde e o sono" 1



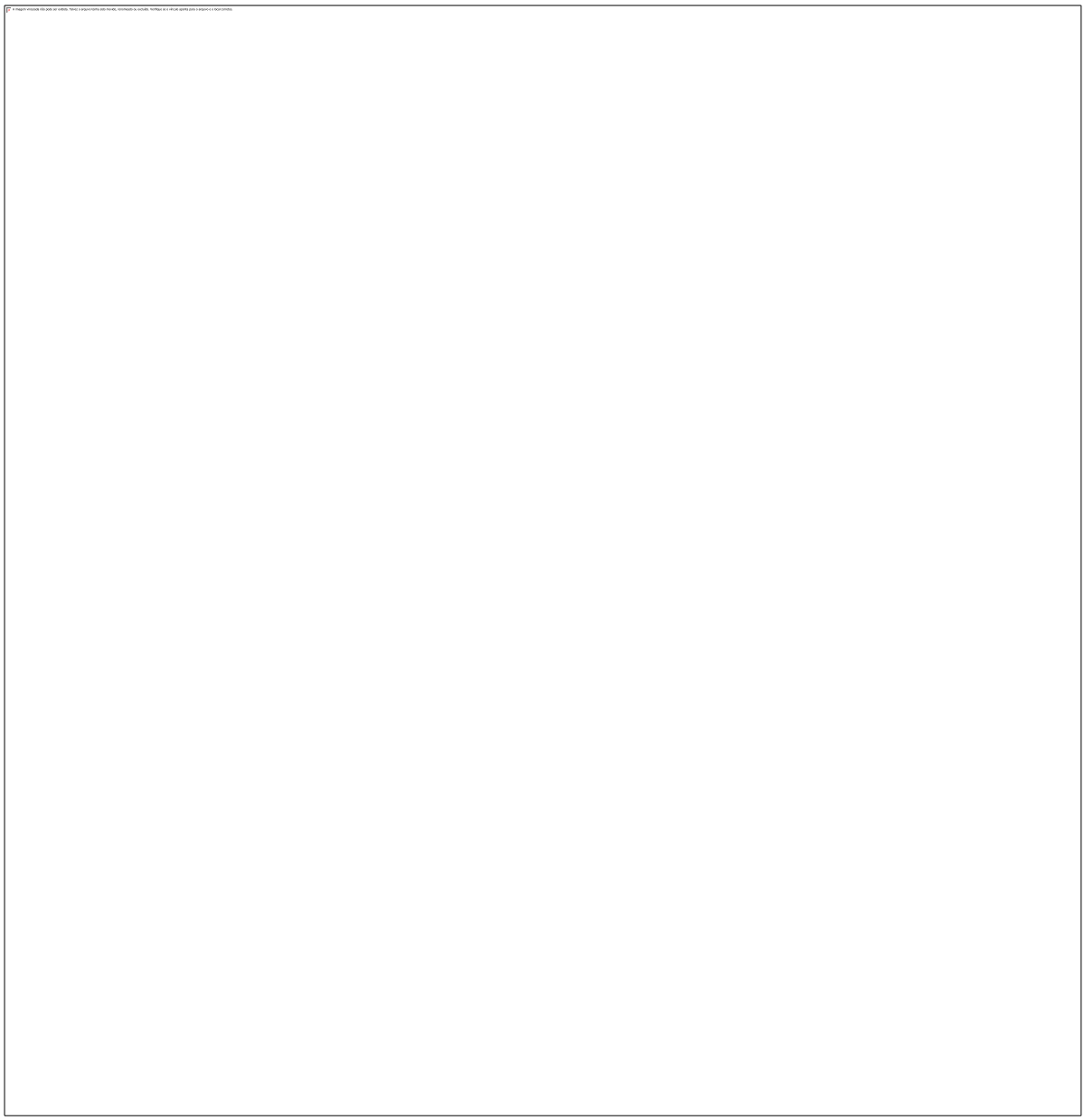
Questionário "saúde e o sono" 2



Questionário "saúde e o sono" 3



Questionário de cronotipo de Munique



escala pediátrica de sonolência diurna

CÓDIGO: HS1439

AUTOR: MARIA EDUARDA OLIVEIRA FERNANDES

COAUTOR: SYLVIA GALVÃO DE VASCONCELOS PINHEIRO

COAUTOR: LUIZA FRANÇA DE SENA

COAUTOR: RUTE GUEDES MELO

ORIENTADOR: FIVIA DE ARAUJO LOPES

TÍTULO: O Status Socioeconômico Subjetivo e o País de Origem na Pró-Socialidade de Crianças: Um Estudo Comparativo entre Brasil e Canadá

Resumo

A cooperação e o compartilhamento de recursos constituem pilares fundamentais para a vida em grupo na espécie humana. A expressão de habilidades cooperativas e pró-sociais é orientada por mecanismos biológicos, mas profundamente moldada pela cultura e pelo ambiente de desenvolvimento. Este estudo investigou como o contexto socioeconômico modula a partilha em crianças de 6 a 10 anos (M = 8,43; DP = 1,42) de dois países com diferentes níveis de desigualdade: Brasil (n = 73) e Canadá (n = 80). Por meio de uma plataforma virtual (Construct 3), as crianças realizaram tarefas para acumular moedas e participaram de uma versão adaptada do Jogo do Ditador (compartilhando com um adulto ou com um par anônimo) e de uma versão adaptada da escala MacArthur (com 5 casas) para medir o Status Socioeconômico Subjetivo (SSS). Dois resultados merecem destaque: 1) observamos que o SSS diminui com a idade e varia de acordo com o país, com crianças canadenses reportando maior SSS, sem relação direta com o Status Socioeconômico Objetivo (OSS); 2) crianças com maior SSS apresentaram menor probabilidade de rejeitar desigualdades auto vantajosas, retendo mais moedas para si. Os resultados indicam que a percepção subjetiva de status social, mais do que os recursos familiares objetivos, desempenha papel crucial na tomada de decisão sobre justiça na infância, evidenciando como normas sociais e desigualdades são transmitidas ao longo das gerações.

Palavras-chave: Pró-socialidade, status subjetivo, infância, estudo transcultural.

TITLE: Subjective Socioeconomic Status and Country of Origin in Children's Prosociality: A Comparative Study Between Brazil and Canada

Abstract

Cooperation and resource sharing constitute fundamental pillars of group life in humans. The expression of cooperative and prosocial behaviors is influenced by biological mechanisms but is deeply shaped by culture and developmental environments. This study investigated how socioeconomic context modulates sharing behavior in children aged 6 to 10 years (M = 8.43; SD = 1.42) from two countries with different levels of inequality: Brazil (n = 73) and Canada (n = 80). Using a virtual platform (Construct 3), children completed tasks to accumulate coins and participated in an adapted version of the Dictator Game (sharing with either an adult or an anonymous peer) and an adapted version of the MacArthur Scale (with five houses) to measure Subjective Socioeconomic Status (SSS). Two findings are particularly noteworthy: 1) SSS decreased with age and varied by country, with Canadian children reporting higher SSS, with no direct association with Objective Socioeconomic Status (OSS); and 2) children with higher SSS were less likely to reject advantageous inequity, retaining more coins for themselves. These findings indicate that the subjective perception of social status, rather than objective family resources, plays a crucial role in children's justice-related decision-making, highlighting how social norms and inequalities are transmitted across generations.

Keywords: Prosociality, Subjective status, Childhood, Cross-cultural study

Introdução

A cooperação e o compartilhamento de recursos são pilares fundamentais da vida em grupo na espécie humana. Sob a perspectiva evolucionista, o comportamento cooperativo constitui um desafio teórico, dado que ações pró-sociais frequentemente envolvem custos imediatos para quem as realiza em benefício de terceiros. Para explicar essa dinâmica, foram propostas formulações clássicas, como a Teoria da Seleção de Parentesco (Hamilton, 1964), na qual favorecemos a transmissão indireta de nossos próprios genes ao cooperar com parentes biológicos; a Teoria do Altruísmo Recíproco (Trivers, 1971), que postula que atos cooperativos são realizados sob a expectativa de retribuição futura; e a Teoria da Reciprocidade Indireta (Alexander, 1985), que aborda os benefícios de se comportar de forma altruísta diante de uma plateia, construindo uma reputação cooperativa favorável que amplia as chances de ganhos em interações sociais subsequentes.

Contudo, a expressão das habilidades cooperativas e pró-sociais não é determinada exclusivamente por mecanismos biológicos, sendo também moldada pela cultura e pelo ambiente de desenvolvimento. Conforme proposto por Boyd e Richerson (2005) na Teoria da Evolução Cultural, a sobrevivência e a propagação de grupos humanos dependem da transmissão de normas culturais e estratégias comportamentais adaptativas.

No desenvolvimento humano, por volta dos nove meses de idade, as crianças começam a compartilhar a atenção com adultos e a alternar papéis em atividades recíprocas; no primeiro ano, desenvolvem imitação recíproca como comunicação não-verbal e, entre

dois e três anos, já engajam em interações cooperativas complexas com pares para alcançar objetivos comuns, demonstrando sensibilidade às trocas pró-sociais de terceiros e às necessidades materiais alheias (Brownell et al., 2006; Dunfield et al., 2011; Tomasello & Vaish, 2013). Ao longo da infância, a partilha (ato de dividir recursos com os outros) se consolida à medida que as crianças internalizam normas de justiça de suas comunidades (Eisenberg et al., 2007; House et al., 2020).

Na transição entre a infância inicial e média, as crianças passam a rejeitar a desigualdade que as favorece (desigualdade auto vantajosa), decidindo partilhar de forma mais equitativa mesmo quando poderiam acumular mais recursos (Blake & McAuliffe, 2011; Fehr et al., 2008). Entretanto, a generosidade e as crenças sobre justiça variam entre sociedades (Henrich et al., 2005; House et al., 2013). O status socioeconômico (SES) desempenha papel central nesse processo, moldando as normas de compartilhamento adotadas pelos adultos e transmitidas às crianças por discurso e observação de modelos (Grusec, 2011; Manstead, 2018). Embora a literatura apresente resultados mistos sobre a associação entre status socioeconômico objetivo (OSS, baseado em renda e escolaridade) e partilha, uma lacuna crucial reside na pouca atenção dada ao Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) - a percepção individual sobre sua posição na hierarquia social. Em adultos, o SSS tem se mostrado associado à pró-socialidade, mas na infância a pesquisa permanece escassa (Genzel Toberman & Sabato, 2025; Kuang et al., 2021).

Dessa forma, investigar o papel do SSS na infância permite compreender o mecanismo psicológico pelo qual a desigualdade estrutural se torna subjetivamente evidente e influencia decisões de partilha. O presente estudo, desenvolvido em colaboração transcultural internacional, compara o desenvolvimento do SSS e da pró-socialidade em crianças do Canadá, país com desigualdade moderada, e do Brasil, historicamente classificado entre os países mais desiguais do mundo segundo o Gini Index. Essa comparação transcultural visa avaliar se a relação entre percepção subjetiva de status social e decisões de partilha é robusta e generalizável ou se é amplificada em contextos de maior disparidade econômica, contribuindo para esclarecer os caminhos de transmissão intergeracional das desigualdades sociais.

Metodologia

Participantes

Participaram 153 crianças com desenvolvimento típico (critério de inclusão), com idades compreendidas entre 6 e 10 anos (M = 8,43 anos, DP = 1,42), recrutadas em dois países: no Canadá participaram 80 crianças (43 meninas e 37 meninos) e no Brasil participaram 73 crianças (34 meninas e 39 meninos). O recrutamento dos participantes ocorreu por meio de bancos de dados de famílias interessadas em pesquisas científicas de três universidades parceiras, além da utilização do método de amostragem por "bola de neve"(um participante indica outros possíveis participantes) e ampla divulgação em redes sociais (Instagram, Facebook e WhatsApp). Com relação ao perfil socioeconômico, a amostra apresentou um viés de classe média e média-alta: 81,04% das famílias possuíam pelo menos um cuidador com ensino superior completo; no Canadá, 58,75% reportaram

renda anual acima de CAD$ 100.000, enquanto no Brasil, 49,31% pertenciam à classe B2 ou superior conforme a classificação do Critério Brasil (ABEP).

Materiais e Equipamentos

As tarefas experimentais foram programadas e executadas na plataforma web de desenvolvimento de jogos virtuais Construct3 (Scirra Ltd., 2021). Os cuidadores completaram questionários sociodemográficos hospedados na plataforma Qualtrics. Para a realização das sessões, as famílias utilizaram seus próprios computadores ou tablets conectados à internet, equipados com câmera e microfone para comunicação por videoconferência via Zoom ou Google Meet.

Procedimentos e Instrumentos

No momento agendado, as famílias participavam de uma chamada de vídeo com uma experimentadora. Após o consentimento livre e esclarecido dos pais (TCLE) e assentimento verbal das crianças (TALE), a experimentadora compartilhava o link do jogo e guiava a criança em uma fase de tutorial interativo para treinar a mecânica de cliques e arraste de objetos na tela. Concluído o tutorial, a experimentadora desligava temporariamente sua câmera e áudio para garantir privacidade e permitir que a criança completasse as atividades de forma independente. As tarefas eram conduzidas por instruções gravadas em áudio e vídeo por um "host" virtual. Os cliques e escolhas das crianças eram registrados e armazenados automaticamente em um servidor web de forma anônima.

As tarefas do jogo envolveram:

Tarefas de Aquecimento (Prática): Quatro ensaios de triagem de objetos, nos quais a criança categorizava figuras em círculos correspondentes, e cinco ensaios de julgamento numérico, comparando a quantidade de triângulos em duas caixas. Cada tarefa concluída adicionava uma "moeda digital" a um cofrinho virtual, totalizando moedas que funcionariam como incentivo e recurso real.

Tarefa de Partilha (Jogo do Ditador adaptado): Foram realizados dois ensaios de alocação de recursos. Em cada ensaio, a criança recebia 10 moedas e era informada de que o destinatário não tinha nenhuma. Nos dois ensaios, de forma contrabalançada, os destinatários eram o “host” virtual adulto (visível na tela) ou um par infantil anônimo (uma criança real descrita como necessitada). As crianças decidiam quantas moedas doar e quantas guardar para si no cofrinho, movendo as moedas livremente antes de finalizar a escolha.

Tarefa de Status Socioeconômico Subjetivo (Escala MacArthur Adaptada): Apresentou-se uma escala pictográfica com 5 casas de tamanhos progressivos e quantidade variável de bens. O “host” virtual explicava que as casas representavam a sociedade, desde pessoas vivendo em casas muito pequenas e com poucas coisas (casa 1) até pessoas vivendo em casas enormes e com muitos recursos (casa 5), perguntando em qual delas a criança considerava que morava na vida real.

Lojinha e Encerramento: Ao final, a criança usava suas moedas para "comprar" um livro infantil (físico ou digital, enviado posteriormente). Os pais retornavam à chamada de

vídeo, respondiam a um formulário sobre o nível de auxílio prestado (escala de 0 a 5) e a sessão era concluída.

Tradução, Adaptação Cultural e Cuidados Éticos

O protocolo foi inicialmente estruturado em inglês e passou por um rigoroso processo de tradução e retrotradução para o português brasileiro por tradutores independentes, seguindo as diretrizes de adaptação transcultural de instrumentos (Borsa et al., 2012). No Brasil, em função da necessidade de inclusão de famílias sem acesso adequado a equipamentos de informática de alto desempenho ou conexões de rede estáveis, disponibilizou-se uma sala de laboratório equipada com computador nas universidades parceiras, mantendo os critérios de privacidade do ambiente online privado.

Resultados e Discussões

Os dados coletados foram analisados estatisticamente no ambiente R Studio (Versão 2024.04.02), com o nível de significância estabelecido em $p = 0,05$. O estudo foi dividido em duas etapas de análises complementares: 1) investigação dos preditores e o desenvolvimento do Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) nas crianças; e 2) verificação se e como a percepção subjetiva do status social e a realidade econômica objetiva da família predizem o comportamento de rejeição à desigualdade auto vantajosa.

1: Caracterização do SSS na Infância

Para investigar o desenvolvimento do SSS infantil em relação à idade, país (Canadá vs. Brasil) e status socioeconômico objetivo (OSS, operacionalizado por meio da renda familiar relativa padronizada em percentis dentro de cada país para permitir comparação direta entre realidades de moedas distintas como o Dólar Canadense e o Real Brasileiro), utilizou-se a modelagem por Modelos de Links Cumulativos (CLMs). Devido à forte concentração de respostas na categoria 4 da escala MacArthur adaptada (casa 4, indicando um provável viés de desejabilidade social ou autorrepresentação em valores moderados), gerando baixa frequência de observações nas categorias inferiores, reorganizamos as respostas em três níveis conceituais estáveis: SSS Baixo (casas 1 a 3), SSS Médio (casa 4) e SSS Alto (casa 5).

Dentre os modelos que nos propusemos a testar, no modelo vencedor incluímos: modelo base predizendo o SSS a partir da idade centrada e percentil de renda relativa (OSS) como efeitos principais fixos e o país como preditor de escala (este modelo demonstrou o melhor ajuste global e parcimônia).

A idade foi um preditor significativo e negativo sobre as avaliações de SSS. Cada ano adicional no desenvolvimento da criança diminuiu de maneira importante as chances de que ela selecionasse uma casa de categoria de status subjetivo superior (OR = 0,626; IC 95% [0,453; 0,864], $z = -2,851$, $p = 0,004$).

Por sua vez, as crianças canadenses apresentaram chances significativamente mais elevadas de reportarem categorias de SSS mais altas em relação às crianças brasileiras (OR = 1,952; IC 95% [1,137; 3,350], z = 2,426, p = 0,015).

No que se refere à renda familiar relativa (Status Socioeconômico Objetivo – OSS), padronizada nacionalmente, não houve qualquer associação independente com as respostas de SSS dadas pelas crianças (OR = 0,992; IC 95% [0,793; 1,242], z = -0,069, p = 0,936).

Por fim, a escala revelou menor variabilidade nos julgamentos de status subjetivo nas crianças canadenses em comparação ao grupo de crianças brasileiras (beta = -0,571; IC 95% [-1,139; -0,051], z = -2,079, p = 0,038).

A literatura do desenvolvimento cognitivo e social nos ajuda a interpretar esses resultados. O declínio significativo das autoavaliações de SSS ao longo da idade reflete um processo adaptativo de calibração social (Amir et al., 2019). Na infância inicial, crianças operam sob um viés cognitivo otimista, conhecido na literatura como "óculos cor-de-rosa" (Boseovski, 2010), avaliando seus lares e recursos de forma inflada. Com o avanço da idade e o consequente amadurecimento das habilidades de comparação social, as crianças de 8 a 10 anos passam a integrar pistas mais precisas sobre recursos materiais externos, calibrando de forma mais refinada seu status autopercebido (Peretz-Lange et al., 2022). O fato de o OSS (recursos objetivos dos pais) não se correlacionar diretamente com o SSS reforça que a percepção infantil sobre desigualdade e rank social é mediada por fatores relacionais e visuais locais. A criança constrói seu status subjetivo baseando-se em comparações imediatas com seus pares escolares e comunitários (como marcas de calçados, posse de eletrônicos ou tipo de moradia) em vez de possuir ciência sobre a renda contábil familiar em moeda corrente (Mistry et al., 2015; Elenbaas, 2019).

As variações identificadas entre os países apoiam teorias de contextualização ecológica. No Canadá, onde a desigualdade geral é menor e o acesso a bens públicos é geograficamente mais homogêneo, as crianças tendem a formar um senso de status subjetivo mais alto e mais coeso (menor variabilidade nas respostas, como revelado pelo componente de escala). Em contrapartida, no Brasil, caracterizado por uma das maiores desigualdades de renda do planeta (World Bank, 2024), os marcadores de estratificação social são onipresentes e geograficamente segregados (Salata et al., 2025; Reis, 2011). Isso gera experiências de socialização marcadamente distintas e polarizadas, resultando em julgamentos de status subjetivo mais flutuantes e heterogêneos entre as crianças brasileiras.

2: O Impacto do SSS no Compartilhamento de Recursos

Será que a autopercepção social (SSS) e a renda familiar objetiva (OSS) guiam o comportamento distributivo infantil frente a um cenário de disparidade que as favorece? Nosso foco foi a Rejeição de Vantagem (variável dependente), codificada de forma binária: 1 se a criança doou pelo menos metade de suas 10 moedas (5 ou mais moedas), promovendo equidade; 0 se doou menos que metade (0 a 4 moedas), escolhendo manter-se favorecida na alocação de recursos. Foram executados Modelos Lineares Mistos Generalizados (GLMMs) com distribuição binomial e funções de ligação logit.

O modelo selecionado foi o que incluiu interações entre o país de origem e o OSS (Renda Relativa). Esta especificação demonstrou o melhor ajuste absoluto e parcimônia. A partir do modelo, obtivemos os seguintes resultados:

Crianças com percepção de maior rank social apresentaram chances significativamente reduzidas de rejeitar a desigualdade favorável (OR = 0,158; IC 95% [0,030; 0,847], estatística z = -2,154, p < 0,05).

O OSS demonstrou associação inversa com a rejeição de vantagem (OR = 0,275; IC 95% [0,074; 1,021], z = -1,928, p = 0,05). Ainda, a interação entre país (Canadá) e OSS revelou-se marginalmente positiva e robusta (OR = 5,464; IC 95 [0,852; 35,023], z = 1,791, p = 0,073/p < 0,10). Tais dados sugerem uma importante tendência contextual: no Brasil, as crianças de menor renda objetiva foram notavelmente mais propensas a rejeitar a desigualdade auto vantajosa do que seus pares brasileiros de renda mais alta, ao passo que no Canadá essa diferença foi amplamente atenuada ou até revertida.

A idade não representou efeito direto significativo sobre a rejeição de vantagem (OR = 2,051; IC 95% [0,780; 5,393], z = 1,456).

Os dados de distribuição descritiva de moedas doadas trazem suporte robusto a estas análises estatísticas. No Canadá, houve 59 ocorrências de crianças retendo todas as moedas para si (doando 0) e 45 ocorrências de divisão igualitária (doando 5). No Brasil, por outro lado, registrou-se apenas 30 ocorrências de doação nula (0 moedas) e expressivas 56 ocorrências de divisão estritamente equitativa (doação de 5 moedas). Com relação à proporção de ensaios com rejeição de vantagem, crianças no Canadá rejeitaram a vantagem em 108 ensaios (do total de 160) e aceitaram em 52, enquanto no Brasil a rejeição ocorreu em 86 ensaios (do total de 146) e a aceitação em 60.

O resultado central de que o SSS elevado prediz menor rejeição de vantagem oferece uma perspectiva empírica inovadora. Tradicionalmente, os estudos focam na percepção de necessidade do outro como gatilho pró-social (Genzel Toberman & Sabato, 2025; Kuhlmeier et al., 2020). Nossos dados mostram que a representação cognitiva que a criança constrói sobre si mesma na escala social é o principal balizador de seu comportamento distributivo. Crianças que se percebem em posições mais elevadas no espectro social tendem a demonstrar maior tolerância à desigualdade quando são as beneficiadas diretas. Psicossocialmente, um SSS elevado pode induzir, mesmo na infância média, noções implícitas de merecimento pessoal desproporcional, direito à retenção ou privilégio adquirido, as quais amortecem a sensibilidade moral diante de desfechos injustos (Kraus et al., 2012; Piff et al., 2010).

Em contraste, o comportamento de partilha mais equitativo exibido por crianças de menor SSS e menor OSS (especialmente no cenário brasileiro) revela mecanismos adaptativos de socialização ecológica. Em contextos sociais de acentuada desigualdade estrutural e instabilidade econômica, estratégias baseadas na interdependência, apoio mútuo e comunalidade tornam-se essenciais para a sobrevivência e estabilização social dos grupos (Guinote et al., 2015; Miller et al., 2015). Crianças criadas nessas circunstâncias parecem ser expostas mais cedo a discursos parentais que priorizam a equidade distributiva e a empatia relacional como formas de neutralizar vulnerabilidades (Brownell et al., 2013). Esses resultados apoiam as proposições da Teoria da Evolução Cultural de Boyd e Richerson (2005), segundo as quais as estratégias cooperativas humanas são sintonizadas

com as pressões do ambiente social e econômico de desenvolvimento imediato das crianças.

No que se refere às limitações do estudo, nossa amostra participante apresentou um viés socioeconômico com concentração de famílias de classe média e alta em ambos os países, o que limitou a variabilidade real das faixas de renda objetiva e pode ter atenuado os efeitos do OSS. Sugere-se que futuras pesquisas expandam esta metodologia virtual para incluir amostras socioeconomicamente mais diversas e vulneráveis, bem como empreguem desenhos de caráter longitudinal capazes de acompanhar o desenvolvimento das noções de SSS e justiça distributiva da infância até a adolescência.

Conclusão

Nossos resultados permitem um avanço na compreensão de como fatores contextuais, socioeconômicos e cognitivos moldam a pró-socialidade na infância.

As conclusões principais indicam que:

- O Status Socioeconômico Subjetivo (SSS) é um constructo psicologicamente ativo na infância média que se dissocia de métricas puramente objetivas de recursos familiares (OSS);
- O SSS infantil sofre uma calibração progressiva e decréscimo em função do desenvolvimento cognitivo e da idade de 6 a 10 anos;
- A autoavaliação de rank social das crianças atua como um preditor consistente de suas decisões de justiça distributiva: crianças que se percebem no topo da hierarquia social são significativamente menos propensas a rejeitar distribuições auto vantajosas de recursos, retendo mais moedas para si;
- O estudo também aponta para tendências contextuais cruciais, com destaque para a maior propensão de crianças brasileiras de menor renda objetiva de rejeitarem desigualdades em comparação com seus pares de renda mais elevada, ilustrando o impacto do cenário de severa desigualdade estrutural do Brasil.

Referências

Alexander, R. D. (1985). A biological interpretation of moral systems. Zygon, 20(1), 3–20.https://doi.org/10.1111/j.1467-9744.1985.tb00574.x

Amir, D., Valeggia, C., Srinivasan, M., Sugiyama, L. S., & Dunham, Y. (2019). Measuring subjective social status in children of diverse societies. PLOS ONE, 14(12), e0226550.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226550

Blake, P. R., & McAuliffe, K. (2011). "I had so much it didn't seem fair": Eight-year-olds reject two forms of inequity. Cognition, 120(2), 215–224.https://doi.org/10.1016/j.cognition.2011.04.006

Borsa, J. C., Damásio, B. F., & Bandeira, D. R. (2012). Cross-cultural adaptation and validation of psychological instruments: Some considerations. Paidéia, 22(53), 423–432.https://doi.org/10.1590/1982-4327225320131449

Boseovski, J. J. (2010). Evidence for "rose-colored glasses": An examination of the positivity bias in young children's personality judgments. Child Development Perspectives, 4(3), 212–218.https://doi.org/10.1111/j.1750-8606.2010.00149.x

Boyd, R., & Richerson, P. J. (2005). The origin and evolution of cultures. Oxford University Press.https://doi.org/10.1093/oso/9780195165241.001.0001

Brownell, C. A., Ramani, G. B., & Zerwas, S. (2006). Becoming a social partner with peers: Cooperation and social understanding in one- and two-year-olds. Child Development, 77(4), 803–821.https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2006.00904.x

Brownell, C. A., Svetlova, M., Anderson, R., Nichols, S. R., & Drummond, J. (2013). Socialization of early prosocial behavior: Parents' talk about emotions is associated with sharing and helping in toddlers. Infancy, 18(1), 91–119.https://doi.org/10.1111/j.1532-7078.2012.00125.x

Dunfield, K., Kuhlmeier, V. A., O'Connell, L., & Kelley, E. (2011). Examining the diversity of prosocial behavior: Helping, sharing, and comforting in infancy. Infancy, 16(3), 227–247.https://doi.org/10.1111/j.1532-7078.2010.00041.x

Eisenberg, N., Fabes, R. A., & Spinrad, T. L. (2007). Prosocial development. In W. Damon & R. M. Lerner (Eds.), Handbook of child psychology: Vol. 3. Social, emotional, and personality development (6th ed., pp. 646–718). John Wiley & Sons.

Elenbaas, L. (2019). Perceived access to resources and young children's fairness judgments. Journal of Experimental Child Psychology, 188, 104667.https://doi.org/10.1016/j.jecp.2019.104667

Fehr, E., Bernhard, H., & Rockenbach, B. (2008). Egalitarianism in young children. Nature, 454(7208), 1079–1083.https://doi.org/10.1038/nature07155

Genzel Toberman, T., & Sabato, H. (2026). Children's subjective socioeconomic status and their sharing decisions: The role of the recipient's neediness. International Journal of Behavioral Development, 50(4), 595–604.https://doi.org/10.1177/01650254251361788

Grusec, J. E. (2011). Socialization processes in the family: Social and emotional development. Annual Review of Psychology, 62, 243–269.https://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131650

Guinote, A., Cotzia, I., Sandhu, S., & Siwa, P. (2015). Social status modulates prosocial behavior and egalitarianism in preschool children and adults. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(3), 731–736.https://doi.org/10.1073/pnas.1414550112

Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. I. Journal of Theoretical Biology, 7(1), 1–16.https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90038-4

Henrich, J., Boyd, R., Bowles, S., Camerer, C., Fehr, E., Gintis, H., McElreath, R., Alvard, M., Barr, A., Ensminger, J., Henrich, N. S., Hill, K., Gil-White, F., Gurven, M., Marlowe, F. W., Patton, J. Q., & Tracer, D. (2005). "Economic man" in cross-cultural perspective: Behavioral experiments in 15 small-scale societies. Behavioral and Brain Sciences, 28(6), 795–815.https://doi.org/10.1017/S0140525X05000142

House, B. R., Kanngiesser, P., Barrett, H. C., Broesch, T., Cebioglu, S., Crittenden, A. N., Erut, A., Lew-Levy, S., Sebastian-Enesco, C., Smith, A. M., Yilmaz, S., & Silk, J. B. (2020). Universal norm psychology leads to societal diversity in prosocial behaviour and development. Nature Human Behaviour, 4(1), 36–44.https://doi.org/10.1038/s41562-019-0734-z

House, B. R., Silk, J. B., Henrich, J., Barrett, H. C., Scelza, B. A., Boyette, A. H., Hewlett, B. S., McElreath, R., & Laurence, S. (2013). Ontogeny of prosocial behavior across diverse societies. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(36), 14586–14591.https://doi.org/10.1073/pnas.1221217110

Kraus, M. W., Piff, P. K., Mendoza-Denton, R., Rheinschmidt, M. L., & Keltner, D. (2012). Social class, solipsism, and contextualism: How the rich are different from the poor. Psychological Review, 119(3), 546–572.https://doi.org/10.1037/a0028756

Kuang, Y., Wang, F., & Wang, Z.-J. (2021). Social class and children's prosociality: A study in the context of China's dual urban–rural structure. Social Psychological and Personality Science, 12(1), 63–70.https://doi.org/10.1177/1948550619887698

Kuhlmeier, V. A., Karasewich, T. A., & Dunfield, K. (2020). Selective prosocial behavior in early childhood. In The social brain: A developmental perspective. MIT Press.

Manstead, A. S. R. (2018). The psychology of social class: How socioeconomic status impacts thought, feelings, and behaviour. British Journal of Social Psychology, 57(2), 267–291.https://doi.org/10.1111/bjso.12251

Miller, J. G., Kahle, S., & Hastings, P. D. (2015). Roots and benefits of costly giving: Children who are more altruistic have greater autonomic flexibility and less family wealth. Psychological Science, 26(7), 1038–1045.https://doi.org/10.1177/0956797615578476

Mistry, R. S., Brown, C. S., White, E. S., Chow, K. A., & Gillen-O'Neel, C. (2015). Elementary school children's reasoning about social class: A mixed-methods study. Child Development, 86(5), 1653–1671.https://doi.org/10.1111/cdev.12407

Peretz-Lange, R., Harvey, T., & Blake, P. R. (2022). From "haves" to "have nots": Developmental declines in subjective social status reflect children's growing consideration of what they do not have. Cognition, 223, 105027.https://doi.org/10.1016/j.cognition.2022.105027

Piff, P. K., Kraus, M. W., Côté, S., Cheng, B. H., & Keltner, D. (2010). Having less, giving more: The influence of social class on prosocial behavior. Journal of Personality and Social Psychology, 99(5), 771–784.https://doi.org/10.1037/a0020092

Reis, E. P. (2011). Elite perceptions of poverty and inequality in Brazil. In M. Blofield (Ed.), The great gap: Inequality and the politics of redistribution in Latin America (pp. 89–108). Pennsylvania State University Press.https://doi.org/10.5325/j.ctv14gp9cw

Salata, A. R., Ribeiro, M. G., & Rodrigues, J. M. (2025). Boletim da desigualdade nas metrópoles: Dados anuais (2012–2024) (Boletim de Desigualdade nas Metrópoles, No. 16). PUCRS.

Scirra Ltd. (2021). Construct 3 [Computer software]. Scirra Ltd.

Tomasello, M., & Vaish, A. (2013). Origins of human cooperation and morality. Annual Review of Psychology, 64, 231–255.https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143812

Trivers, R. L. (1971). The evolution of reciprocal altruism. The Quarterly Review of Biology, 46(1), 35–57.https://doi.org/10.1086/406755

World Bank. (2024). Gini index. World Bank Poverty and Inequality Platform.https://data.worldbank.org/indicator/SI.POV.GINI

CÓDIGO: HS1549

AUTOR: LETICIA GONCALVES BENIGNO

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Perfil hierárquico e desenvolvimento ovariano em Dinoponera quadriceps

Resumo

As formigas apresentam elevada organização social, sendo comum a presença de castas morfologicamente distintas, como rainhas e operárias, associadas a diferentes funções na colônia. Entretanto, *Dinoponera quadriceps,* pertencente à subfamília Ponerinae, não apresenta castas morfologicamente distintas entre as fêmeas. Nessa espécie, as operárias possuem potencial reprodutivo, sendo a reprodução regulada principalmente por relações sociais e pela posição ocupada na hierarquia. A posição hierárquica pode estar associada a alterações fisiológicas relacionadas à reprodução, sendo o desenvolvimento ovariano um importante indicador do estado reprodutivo. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil hierárquico das colônias e analisar o desenvolvimento ovariano das operárias de acordo com sua posição na hierarquia. Foram realizadas gravações de quatro colônias durante cinco dias, em três períodos distintos, totalizando 15 horas por colônia. Os comportamentos agonísticos foram analisados no software BORIS e utilizados para estabelecer o ranking hierárquico por meio do David's Score. Posteriormente, operárias de diferentes níveis hierárquicos foram selecionadas para análise dos ovários. Os resultados indicaram maior largura ovariana nas operárias de alta hierarquia, além da presença de oócitos com vitelo e maior ocorrência de corpos amarelos nesse grupo. Esses resultados sugerem associação entre posição hierárquica e atividade reprodutiva em *D. quadriceps.*

Palavras-chave: Dinoponera quadriceps; hierarquia social, desenvolvimento ovariano.

TITLE: Hierarchical profile and ovarian development in Dinoponera quadriceps.

Abstract

Ants display a high level of social organization, commonly characterized by the presence of morphologically distinct castes, such as queens and workers, associated with different functions within the colony. However, *Dinoponera quadriceps*, belonging to the subfamily Ponerinae, does not present morphologically distinct female castes. In

this species, workers possess reproductive potential, and reproduction is mainly regulated by social interactions and hierarchical position. Hierarchical rank may be associated with physiological changes related to reproduction, with ovarian development serving as an important indicator of reproductive status. Thus, this study aimed to characterize the hierarchical profile of colonies and analyze worker ovarian development according to their position in the hierarchy. Four colonies were recorded over five days during three distinct periods, totaling 15 hours per colony. Agonistic behaviors were analyzed using BORIS software and used to establish the hierarchical ranking through David's Score. Subsequently, workers from different hierarchical levels were selected for ovarian analysis. The results indicated greater ovarian width in high-ranking workers, as well as the presence of vitellogenic oocytes and a higher occurrence of corpora lutea in this group. These findings suggest an association between hierarchical position and reproductive activity in *D. quadriceps*.

Keywords: Dinoponera quadriceps; social hierarchy; ovarian development.

Introdução

A classe Insecta constitui um dos grupos animais mais diversos e abundantes da Terra, ocupando praticamente todos os ambientes terrestres e desempenhando importantes funções na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas (Grimaldi & Engel, 2005; Gullan & Cranston, 2014). Ao longo de sua história evolutiva, os insetos desenvolveram diversas estratégias adaptativas que possibilitaram sua ampla distribuição e elevada riqueza de espécies (Grimaldi & Engel, 2005). Além disso, desempenham importantes funções ecológicas, atuando na decomposição da matéria orgânica, reciclagem de nutrientes, controle biológico e polinização (Samways, 1994; Parra et al., 2002; Free, 1970; Bawa et al., 1985; Roubik, 1995; Proctor, 1996).

Entre os insetos, existem diferentes níveis de organização social, desde espécies solitárias até sociedades altamente complexas. A eussocialidade representa uma das formas mais elaboradas de organização social, caracterizada pela divisão de trabalho entre indivíduos reprodutivos e não reprodutivos, cooperação no cuidado da prole e sobreposição de gerações (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990; Maynard Smith & Szathmáry, 1995). Entre os insetos eussociais, as formigas (Hymenoptera: Formicidae) destacam-se pela elevada diversidade e complexidade de suas sociedades.

Na maioria das espécies de formigas, a organização das colônias está associada à presença de castas morfologicamente distintas, como rainhas, machos e operárias. As rainhas são responsáveis pela reprodução, enquanto as operárias desempenham atividades como cuidado da prole, manutenção do ninho, defesa e forrageamento. Em algumas espécies, as operárias ainda apresentam subdivisões em subcastas, refletindo diferentes graus de especialização funcional (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990). Entretanto, algumas espécies não apresentam castas reprodutivas morfologicamente distintas.

Nesse contexto, *Dinoponera quadriceps*, pertencente à subfamília Ponerinae, apresenta fêmeas morfologicamente semelhantes e com potencial reprodutivo, sendo a reprodução

regulada principalmente por mecanismos comportamentais e hierárquicos (Peeters, 1991; Asher et al., 2013). A reprodução encontra-se associada às operárias que ocupam posições superiores na hierarquia, especialmente a operária alfa (Monnin & Peeters, 1999). As relações de dominância são estabelecidas por comportamentos agonísticos, que contribuem para a manutenção da estrutura hierárquica da colônia (Monnin & Peeters, 1999). A operária alfa apresenta maior probabilidade de se tornar uma gamergate, isto é, uma operária fecundada que assume a função reprodutiva (Peeters & Crewe, 1984). A aquisição da função reprodutiva está associada a alterações fisiológicas, incluindo o desenvolvimento dos ovários (Liebig et al., 2000; Penick et al., 2011, 2014; Okada et al., 2015; Sheng et al., 2020).

O desenvolvimento ovariano pode, portanto, estar relacionado à posição ocupada pelas operárias na hierarquia social, uma vez que indivíduos de maior status tendem a apresentar maior atividade reprodutiva (Penick et al., 2011). Apesar dos avanços no conhecimento sobre hierarquia e reprodução em *D. quadriceps*, ainda são necessários estudos que integrem aspectos comportamentais e fisiológicos para compreender essa relação. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil hierárquico das colônias e analisar o desenvolvimento ovariano das operárias de acordo com sua posição na hierarquia, buscando compreender como a organização social está associada à diferenciação fisiológica e à reprodução em *D. quadriceps.*

Metodologia

Área de estudo e manutenção das colônias

Foram utilizadas quatro colônias de *Dinoponera quadriceps* coletadas na Floresta Nacional de Nísia, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), licença nº 88316-9. Após a coleta, as colônias foram mantidas em laboratório em ninhos artificiais de gesso, instalados no interior de arenas com aproximadamente 1 m², forradas com vermiculita. As colônias foram mantidas sob condições laboratoriais e alimentadas quatro vezes por semana com larvas de Tenebrio molitor, com água disponibilizada ad libitum.

Identificação individual

Para possibilitar o reconhecimento individual das operárias durante as observações comportamentais, os indivíduos foram marcados com canetas atóxicas de diferentes cores e receberam uma pequena placa plástica contendo um código exclusivo, composto por letras e números, fixada na região do tórax (Corbara et al., 1986) (Imagem 1). A combinação de cores e códigos permitiu identificar individualmente as operárias durante as gravações e registrar a direcionalidade das interações agonísticas.

Perfil hierárquico

Para a definição do perfil hierárquico das colônias, foram realizadas gravações das câmeras posicionadas de modo a possibilitar o acompanhamento das diferentes áreas do ninho. As filmagens foram realizadas com o auxílio de telefone celular apoiado em tripé, durante cinco dias consecutivos, em três períodos distintos: manhã, das 09:00 às 10:00 horas; início da tarde, das 13:00 às 14:00 horas; e final da tarde, das 17:00 às 18:00 horas, totalizando 15 horas de registro por colônia.

Os vídeos foram analisados por meio da metodologia de registro contínuo (continuous recording), conforme Martin e Bateson (1993), com foco nas interações agonísticas entre as operárias. Os comportamentos foram registrados no software BORIS (Friard & Gamba, 2016), considerando o tipo de interação e sua direcionalidade, identificando-se a operária autora e a operária alvo de cada comportamento.

O etograma utilizado foi elaborado com base nas descrições de Monnin e Peeters (1999). Foram considerados seis comportamentos de dominância descritos para D. quadriceps: bloqueio, esfregar o gáster ou marcação, curvatura do gáster, boxe antenal, imobilização e mordida nas pernas. Além desses comportamentos, foram incluídos recuo e mordida na mandíbula. A partir das interações registradas, foi calculado o David's Score (DS; David, 1987), utilizado para estabelecer o ranking hierárquico das operárias dentro de cada colônia.

Após a obtenção dos valores de DS, as operárias foram classificadas em três categorias hierárquicas: alta, média e baixa. Para representar cada categoria, foram selecionadas operárias de acordo com seu posicionamento no ranking, sendo posteriormente utilizadas para a análise do desenvolvimento ovariano.

Análise do desenvolvimento ovariano

Após a definição das categorias hierárquicas, as operárias selecionadas foram eutanasiadas e submetidas à dissecação para análise dos ovários. O gáster de cada indivíduo foi dissecado em água e os ovários foram examinados sob microscópio. Foram avaliados o tamanho dos ovários, a presença de oócitos com vitelo e a presença de corpos amarelos, estruturas associadas à atividade reprodutiva(Imagem 2).

A largura dos ovários foi mensurada em milímetros e utilizada como medida do desenvolvimento ovariano. Além da medida morfométrica, a presença ou ausência de oócitos com vitelo e corpos amarelos foi registrada para cada indivíduo, permitindo caracterizar diferenças no estado reprodutivo entre as categorias hierárquicas.

Análise dos dados

Para avaliar a relação entre a posição hierárquica e o desenvolvimento ovariano, a largura dos ovários foi comparada entre as categorias de alta, média e baixa hierarquia. Também foram comparadas as frequências de indivíduos que apresentaram oócitos com vitelo e corpos amarelos entre os diferentes níveis hierárquicos. Dessa forma, buscou-se verificar se operárias posicionadas em diferentes estratos da hierarquia social apresentavam diferenças no desenvolvimento e na atividade ovariana(Imagem 3).

Resultados e Discussões

Perfil hierárquico e comportamentos agonísticos

A análise dos comportamentos agonísticos registrados nas quatro colônias de *Dinoponera quadriceps* permitiu estabelecer o perfil hierárquico das operárias a partir da direcionalidade das interações e dos valores obtidos pelo David's Score (DS). A análise das interações possibilitou identificar diferenças no direcionamento dos comportamentos agonísticos entre as operárias e estabelecer um ranking social dentro das colônias, posteriormente utilizado para classificar os indivíduos em diferentes categorias hierárquicas.

Foram registrados comportamentos agonísticos relacionados às interações de dominância, incluindo bloqueio, curvatura do gáster, esfregar o gáster ou marcação, boxe antenal, imobilização, mordida nas pernas, recuo e mordida na mandíbula. Esses comportamentos estão relacionados às interações de dominância descritas para *D. quadriceps* por Monnin e Peeters (1999), que demonstraram a importância das interações agonísticas na organização e manutenção da hierarquia social nessa espécie.

A existência de uma hierarquia de dominância é particularmente relevante em *D. quadriceps* devido à ausência de castas reprodutivas morfologicamente distintas. Diferentemente de espécies nas quais a função reprodutiva está associada a uma rainha morfologicamente diferenciada, as fêmeas de D. quadriceps apresentam características morfológicas semelhantes e potencial reprodutivo, sendo o acesso à reprodução regulado principalmente por relações sociais. Dessa forma, as interações agonísticas desempenham papel importante na organização da colônia e na manutenção das posições sociais ocupadas pelas operárias (Peeters, 1991; Monnin & Peeters, 1999).

A classificação das operárias em diferentes níveis hierárquicos permitiu investigar se essa diferenciação social também estaria associada a diferenças fisiológicas relacionadas à reprodução. Assim, o ranking comportamental estabelecido a partir das interações agonísticas constituiu a base para a seleção dos indivíduos utilizados posteriormente na análise do desenvolvimento ovariano.

Desenvolvimento ovariano segundo a posição hierárquica

A largura dos ovários apresentou diferença significativa entre as categorias hierárquicas ($F_{2,8} = 5,53$; $p = 0,007$). As operárias classificadas como de baixa hierarquia apresentaram a menor largura ovariana média, de 0,546 ± 0,057 mm (n = 4), seguidas pelas operárias de média hierarquia, com 0,680 ± 0,155 mm (n = 4). As operárias de alta hierarquia apresentaram a maior largura ovariana média, de 1,319 ± 0,605 mm (n = 3)(Imagem 4).

Embora a análise geral tenha indicado diferença significativa entre as categorias, as comparações realizadas entre os grupos individualmente não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A comparação entre as categorias de baixa e alta hierarquia apresentou valor próximo ao limite de significância (p = 0,058). Esse resultado sugere que a diferença geral observada entre as categorias está principalmente

relacionada aos maiores valores de largura ovariana apresentados pelas operárias de alta hierarquia.

O padrão observado sugere uma associação entre a posição social das operárias e o desenvolvimento dos ovários. As operárias que ocupavam posições superiores na hierarquia apresentaram maior largura ovariana em comparação às operárias de média e baixa hierarquia. Esse resultado é consistente com a organização reprodutiva descrita para formigas que não apresentam castas reprodutivas morfologicamente diferenciadas, nas quais a reprodução pode estar concentrada nos indivíduos que ocupam posições sociais superiores (Peeters, 1991; Monnin & Peeters, 1999).

Penick *et al.* (2011) demonstraram que diferenças no estado reprodutivo das operárias podem estar associadas à posição social ocupada dentro da colônia, sendo indivíduos envolvidos na reprodução caracterizados por maior desenvolvimento ovariano. Dessa forma, a maior largura dos ovários observada nas operárias de alta hierarquia no presente estudo pode estar relacionada a uma maior ativação ovariana nesses indivíduos.

Entretanto, a largura ovariana, isoladamente, não permite determinar se uma operária estava efetivamente exercendo a função reprodutiva no momento da análise. Por esse motivo, a avaliação foi complementada pela observação da presença de oócitos com vitelo e corpos amarelos, permitindo uma caracterização mais abrangente do estado reprodutivo dos indivíduos.

Indicadores de atividade reprodutiva

Além das diferenças observadas na largura dos ovários, foram identificadas diferenças entre as categorias hierárquicas quanto à presença de oócitos com vitelo. Todas as quatro operárias classificadas como de alta hierarquia apresentaram oócitos com vitelo, correspondendo a 100% dos indivíduos analisados nessa categoria. Em contraste, não foram observados oócitos com vitelo nas operárias de média ou baixa hierarquia.

A presença de oócitos com vitelo nas operárias de alta hierarquia constitui uma evidência complementar ao maior desenvolvimento ovariano observado nesse grupo. A ocorrência de vitelogênese está relacionada ao desenvolvimento dos oócitos e indica atividade ovariana, de modo que a presença dessa característica exclusivamente nas operárias de alta hierarquia reforça a possibilidade de maior atividade reprodutiva nesses indivíduos.

Também foram observados corpos amarelos em todas as operárias de alta hierarquia (100%). Entre as operárias de média hierarquia, essa estrutura foi observada em uma das quatro operárias analisadas (25%), enquanto nenhuma das operárias de baixa hierarquia apresentou corpos amarelos (0%).

A maior ocorrência de corpos amarelos entre as operárias de alta hierarquia é compatível com a maior atividade reprodutiva observada nesse grupo. Em conjunto, a presença de corpos amarelos e oócitos com vitelo, associada à maior largura ovariana, indica que as operárias de alta hierarquia apresentaram não apenas ovários maiores, mas também características fisiológicas compatíveis com maior atividade reprodutiva.

Assim, os resultados obtidos apontam para um padrão consistente entre os diferentes indicadores avaliados. As operárias de alta hierarquia apresentaram maior largura ovariana, presença de oócitos com vitelo e maior ocorrência de corpos amarelos, enquanto esses indicadores foram ausentes ou menos frequentes nas categorias de média e baixa hierarquia.

Relação entre hierarquia social e reprodução

Em conjunto, os resultados sugerem que a posição ocupada pelas operárias na estrutura social da colônia está associada ao seu estado reprodutivo. A maior largura ovariana, a presença de oócitos com vitelo e a maior ocorrência de corpos amarelos nas operárias de alta hierarquia indicam uma possível associação entre o status social e a atividade reprodutiva.

Esse padrão é especialmente relevante para D. quadriceps, uma vez que, diferentemente de espécies nas quais a reprodução é realizada por uma rainha morfologicamente diferenciada, as fêmeas dessa espécie são morfologicamente semelhantes e apresentam potencial reprodutivo. Nesse contexto, a posição hierárquica constitui um importante mecanismo de organização da reprodução, sendo a operária alfa geralmente aquela que apresenta maior probabilidade de assumir a função reprodutiva (Peeters, 1991; Monnin & Peeters, 1999).

A relação observada entre hierarquia e desenvolvimento ovariano também pode ser compreendida considerando as alterações fisiológicas associadas à aquisição da função reprodutiva. Em formigas, a mudança para um estado reprodutivo pode envolver alterações no desenvolvimento ovariano e em diferentes sistemas fisiológicos (Liebig et al., 2000; Penick et al., 2011, 2014; Okada et al., 2015; Sheng et al., 2020). Dessa forma, o maior desenvolvimento ovariano observado nas operárias de alta hierarquia é compatível com a associação entre posição social e condição reprodutiva.

Os resultados também reforçam a importância dos mecanismos comportamentais na organização das colônias de D. quadriceps. Em espécies que apresentam castas morfológicas bem definidas, a diferenciação entre rainhas e operárias fornece uma distinção corporal evidente entre indivíduos reprodutivos e não reprodutivos. Em D. quadriceps, entretanto, a ausência dessa diferenciação torna as relações sociais fundamentais para compreender como a reprodução é organizada na colônia.

Nesse sentido, a integração entre os dados comportamentais e fisiológicos permite compreender de maneira mais abrangente a relação entre dominância e reprodução. A hierarquia estabelecida a partir dos comportamentos agonísticos pode estar relacionada não apenas à distribuição das funções sociais, mas também à diferenciação fisiológica entre as operárias.

Apesar do padrão observado, os resultados devem ser interpretados com cautela devido ao número reduzido de indivíduos analisados. Além disso, na categoria de alta hierarquia, uma operária apresentou o ovário rompido durante a dissecação, impossibilitando a mensuração de sua largura. Dessa forma, a análise dessa variável foi realizada com três indivíduos na categoria de alta hierarquia, embora tenha sido possível confirmar a presença de oócitos com vitelo e corpos amarelos nos quatro indivíduos dessa categoria.

Outro aspecto a ser considerado é que, apesar da diferença significativa observada na análise geral da largura ovariana, as comparações entre os grupos individualmente não foram estatisticamente significativas. Portanto, os resultados indicam uma associação entre posição hierárquica e desenvolvimento ovariano, mas não permitem afirmar uma relação causal entre essas variáveis.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam uma associação entre a posição hierárquica e o desenvolvimento ovariano das operárias de *Dinoponera quadriceps.* As operárias de alta hierarquia apresentaram maior largura ovariana, além da presença de oócitos com vitelo e maior ocorrência de corpos amarelos, características que, em conjunto, são compatíveis com maior atividade reprodutiva nesse grupo.

Esses resultados reforçam a importância das relações sociais na organização da reprodução em *D. quadriceps*, uma espécie que não apresenta castas reprodutivas morfologicamente distintas. Dessa forma, a integração entre os dados comportamentais e fisiológicos contribui para compreender como a posição hierárquica pode estar associada à diferenciação reprodutiva das operárias.

Entretanto, considerando o número reduzido de colônias e indivíduos analisados, são necessários estudos futuros com maior tamanho amostral para confirmar a consistência desse padrão. A ampliação do número de colônias e de operárias por categoria hierárquica, bem como o acompanhamento dos indivíduos ao longo do tempo, poderá contribuir para compreender de maneira mais detalhada a relação entre hierarquia social, desenvolvimento ovariano e reprodução nessa espécie.

Referências

Anderson, M. J. (2001). Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 58(3), 626–639.https://doi.org/10.1139/cjfas-58-3-626

Gonzalez, L., & Manly, B. F. J. (1998). Analysis of variance by randomization with small data sets. Environmetrics, 9(1), 53–65.https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-095X(199801/02)9:1%3C53::AID-ENV285%3E3.0.CO;2-%23

Hervé, M. (2025). RVAideMemoire: Testing and plotting procedures for biostatistics (R package version 0.9-83-12).https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire

MOTIC CHINA GROUP. Motic Images Plus: versão 3.0 (x64). [S.l.]: Motic, 2016. Software.

Norman, V. C., Pamminger, T., Nascimento, F., & Hughes, W. O. H. (2019). The role of juvenile hormone in regulating reproductive physiology and dominance in Dinoponera quadriceps ants. PeerJ, 7, e6512.https://doi.org/10.7717/peerj.6512

Le système reproductif chez une ponérine sans reine: Dinoponera quadriceps santschi - PubMed

RELEVÂNCIA DOS INSETOS EM TERMOS ECOLÓGICOS E SUAS INTERAÇÕES COM O SER HUMANO: CONTRIBUIÇÕES PARA A EDUCAÇÃO AMBIENTAL

Os insetos sociais: Richards, Owain Westmacott, 1901- : Download gratuito, emprestado e streaming : Internet Archive

Peeters, C. (1991). The occurrence of sexual reproduction among ant workers. Biological Journal of the Linnean Society, 44(2), 141–152.https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00612.x

Yagound, B., Blacher, P., Fresneau, D., Poteaux, C., & Châline, N. (2014). Status discrimination through fertility signalling allows ants to regulate reproductive conflicts. Animal Behaviour, 93, 25–35.https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.04.014

Asher, C. L., Nascimento, F. S., Sumner, S., & Hughes, W. O. H. (2013). Division of labour and risk taking in the dinosaur ant, Dinoponera quadriceps (Hymenoptera: Formicidae). Myrmecological News, 18, 121–129.

Anexos

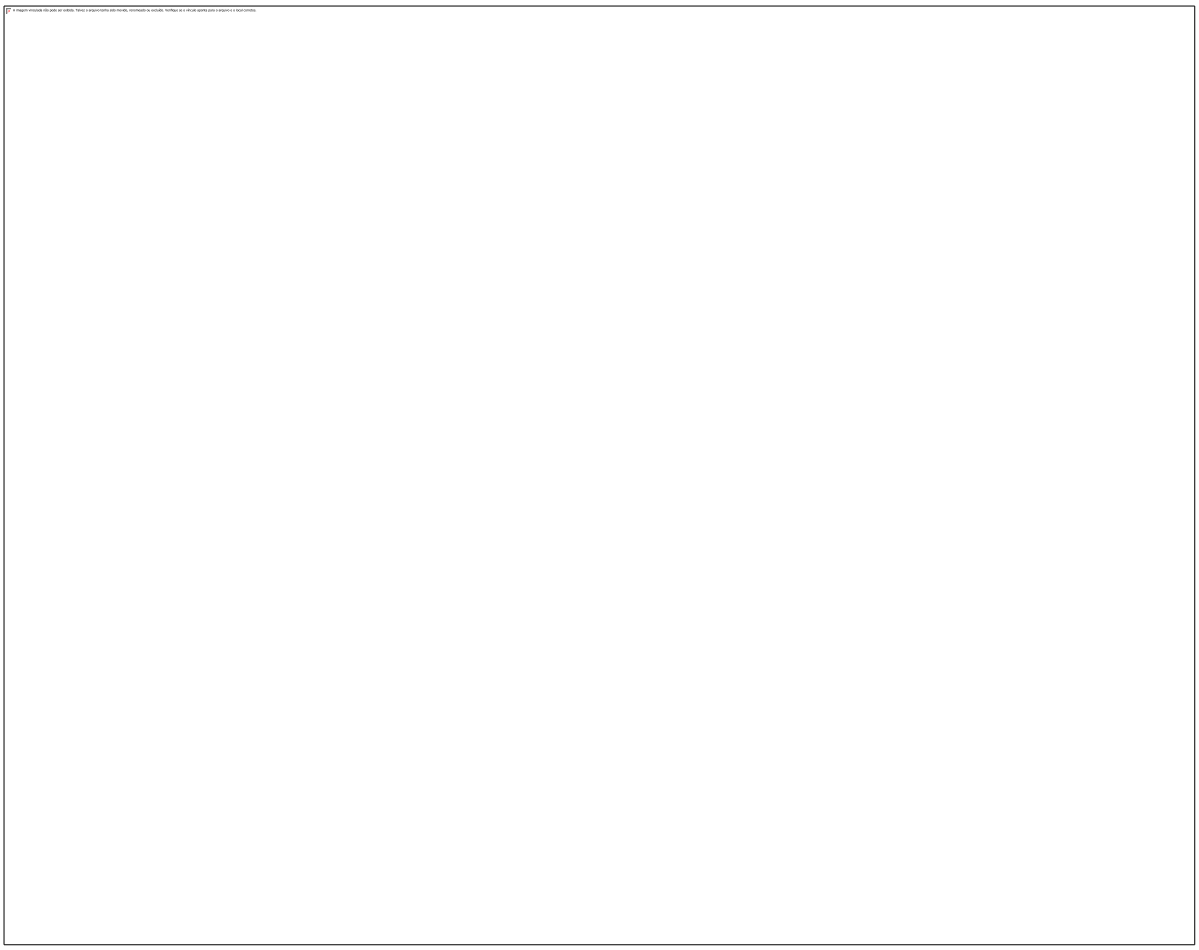


Imagem 1



Imagem 2

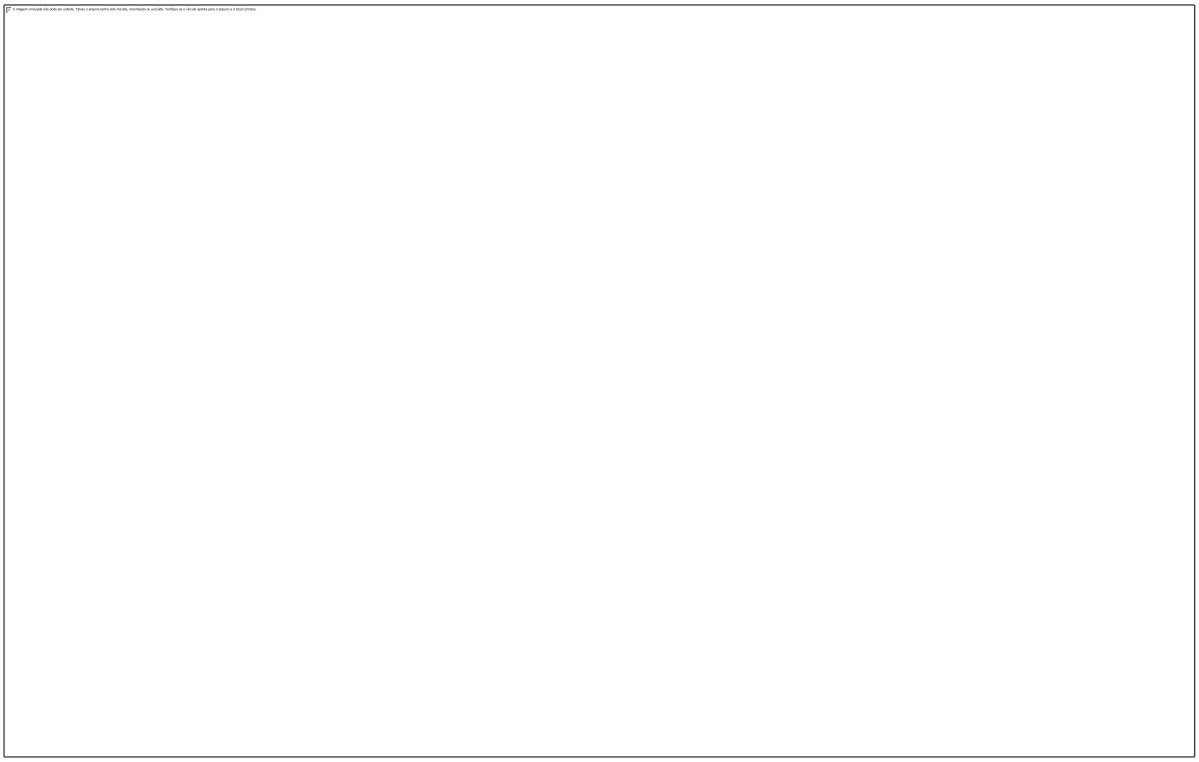


Imagem 3



Imagem 4

CÓDIGO: HS1587

AUTOR: WILLIAN LIMA KIANG

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: HIERARQUIA E DIVISÃO DE TRABALHO EM DINOPONERA QUADRICEPS

Resumo

A divisão de trabalho em formigas Ponerinae sem casta morfológica de rainha é regulada por interações agonísticas que estabelecem a hierarquia social. O estudo investigou a relação entre o status hierárquico e a divisão de tarefas em Dinoponera quadriceps, analisando como o cuidado com a prole, a manutenção do ninho e o forrageamento são distribuídos entre operárias de Alta, Média e Baixa hierarquia. Registrou-se a direcionalidade das interações agonísticas para determinar o perfil hierárquico via David's Score e agrupamento K-means. A execução de tarefas foi quantificada por amostragem de varredura (1.068 observações válidas) e analisada via Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM). Os resultados demonstraram uma segregação clara de tarefas: o cuidado com a prole esteve predominantemente concentrado na Alta hierarquia (11,94% ± 4,57%), garantindo as fêmeas dominantes no centro reprodutivo da colônia. A manutenção do ninho associou-se à Média hierarquia (2,23% ± 1,20%), atuando como um grupo intermediário de infraestrutura. O forrageamento ocorreu exclusivamente na Baixa hierarquia (12,93%), com forte especialização individual, o que minimiza os riscos às fêmeas de alto valor reprodutivo. Conclui-se que a hierarquia social em D. quadriceps organiza a divisão de trabalho de forma eficiente, otimizando recursos energéticos e assegurando a estabilidade do grupo.

Palavras-chave: Formigas sem rainha.Hierarquia.dominância.Tarefa.Grooming.Dinponera

TITLE: OMINANCE HIERARCHY AND DIVISION OF LABOR IN DINOPONERA QUADRICEPS

Abstract

Division of labor in queenless Ponerinae ants is regulated by agonistic behavioral interactions that establish social hierarchy. This study investigated the relationship between dominance status and task allocation in Dinoponera quadriceps, analyzing how brood care, nest maintenance, and foraging are distributed among High-, Medium-, and Low-rank workers. Agonistic interaction directionality was recorded to determine the individual hierarchy profile using David's Score and K-means clustering. Task

performance was quantified through scan sampling (1,068 valid observations) and analyzed via Generalized Linear Mixed Models (GLMM). Results demonstrated a clear task segregation: brood care was predominantly concentrated in High-rank workers (11.94% ± 4.57%), maintaining dominant females in the colony's reproductive center. Nest maintenance was associated with Medium-rank workers (2.23% ± 1.20%), serving as an intermediate infrastructure group. Foraging occurred exclusively in Low-rank workers (12.93%), with strong individual specialization, minimizing risks to females of high reproductive value. In conclusion, the social hierarchy in D. quadriceps efficiently organizes the division of labor, optimizing energy allocation and ensuring group stability.

Keywords: Queenless ants; Dominance hierarchy; Division of labor; Dinoponera qua

Introdução

A eussocialidade é um dos fenômenos evolutivos mais complexos observados em invertebrados, estando proeminentemente representada na ordem Hymenoptera (Wilson, 1971; Turner et al., 2026). Esse nível de organização social é classicamente definido pelo cuidado cooperativo com a prole, pela sobreposição de gerações e pela divisão do trabalho em castas reprodutivas e não reprodutivas (Wilson, 1971; Martin & Bateson, 1993). Na maioria das espécies de formigas, essa divisão ocorre por meio de castas morfológicas, na qual rainhas especializadas dedicam-se à postura de ovos enquanto operárias morfologicamente distintas realizam as demais tarefas do ninho (Turner et al., 2026). Contudo, a hipótese de tamanho-complexidade sugere que, embora colônias populosas favoreçam essa diferenciação rígida, sociedades menores ou linhagens específicas podem apresentar arranjos sociais alternativos e mais flexíveis (Grainger et al., 2014).

Na subfamília Ponerinae, diversas espécies não apresentam casta morfológica de rainha, mantendo todas as operárias totipotentes e fisiologicamente capazes de se reproduzir (Araujo et al., 1988; Lima, 2023). Nesses grupos, a função reprodutiva é assumida por uma ou poucas fêmeas dominantes conhecidas como gamergates (Araujo & Jaisson, 1994). A definição desse status ocorre por meio de hierarquias de dominância rigorosas, reguladas por interações agonísticas diretas como boxe antenal e bloqueios (Monnin & Peeters, 1999). Adicionalmente, a posição na hierarquia social e o perfil comportamental individual podem ser modulados pela maturidade fisiológica e pela idade das fêmeas (Denis et al., 2008).

A organização das tarefas em algumas espécies de Ponerinae é modulada tanto pela hierarquia de dominância quanto pelo polietismo temporal, no qual a maturidade fisiológica e a idade das operárias influenciam a alocação funcional individual (Denis et al., 2008; Lima, 2023). Em espécies sem rainhas, indivíduos mais jovens e de alta Hierarquia tendem a desempenhar atividades no interior do ninho, como o cuidado direto com a prole, enquanto operárias mais velhas ou subordinadas são gradualmente deslocadas para tarefas periféricas e de maior risco externo (Monnin & Peeters, 1998; Asher et al., 2013). Essa estrutura gera um padrão claro de especialização individual por categoria hierárquica, otimizando gasto energético individual e reduzindo conflitos reprodutivos no centro da colônia (Grainger et al., 2014).

Essa especialização, porém, não é rígida ou irreversível. Operárias de D. quadriceps mantêm notável plasticidade adaptativa e flexibilidade comportamental, reajustando suas funções entre tarefas internas e forrageamento conforme as necessidades dinâmicas da colônia (Denis et al., 2008; Grainger et al., 2014). A hierarquia social que regula essas funções é estruturada por um repertório de comportamentos agonísticos como boxe antenal, bloqueio e curvatura do gáster exibidos sobretudo por indivíduos dominantes (Monnin & Peeters, 1999). O registro dessas interações permite quantificar o status hierárquico para investigar como essa agressividade ritualizada regula a divisão de trabalho.

Embora a literatura já registre estudos sobre a biologia social de Dinoponera quadriceps (Monnin & Peeters, 1999; Asher et al., 2013), ainda se faz necessário quantificar com maior precisão como a hierarquia interpõe-se no cotidiano funcional e na rotina da colônia (Grainger et al., 2014). (Grainger et al., 2014). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar a relação entre a hierarquia de dominância e a divisão de trabalho em D. quadriceps, avaliando como tarefas fundamentais como o cuidado com a prole, a manutenção do ninho e o forrageamento são distribuídas entre as categorias hierárquicas (Alta, Média e Baixa hierarquia) das operárias.

Metodologia

Coleta, Acomodação e Manutenção das Colônias

Quatro colônias de Dinoponera quadriceps foram coletadas na Unidade de Conservação de Nísia Floresta/ICMBio (6°5′S, 35°12′O; licença nº 88316-9) e transportadas para o Laboratório de Biologia Comportamental da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal (RN). Cada colônia foi instalada em uma arena de madeira de 1 m² revestida de fórmica e forrada com vermiculita, contendo um ninho de gesso ao centro.

Após uma semana de aclimatação, os indivíduos foram identificados por combinações de cores no corpo com caneta atóxica e placas com códigos exclusivos no tórax (Corbara et al., 1986). O laboratório foi mantido sob temperatura de 25–30 ºC, umidade relativa de ~70% e fotoperíodo de 12h (luzes acesas das 06:00 às 18:00 h). A alimentação foi fornecida três vezes por semana (larvas de Tenebrio molitor, mel, frutas e água ad libitum).

Determinação do Perfil Hierárquico e Etograma

O perfil hierárquico foi estabelecido por filmagens do ninho via smartphone em tripé durante cinco dias, em três períodos diários (09:00–10:00 h, 13:00–14:00 h e 17:00–18:00 h), perfazendo 15 horas gravadas por colônia. As interações agonísticas foram analisadas no software BORIS (Friard & Gamba, 2016) por amostragem de registro contínuo (Martin & Bateson, 1993), identificando-se o tipo de comportamento e a direcionalidade (autora e alvo).

O etograma baseou-se em Monnin e Peeters (1999), englobando seis comportamentos de dominância (bloqueio, esfregar o gáster/marcar, curvar o gáster, boxe antenal, imobilização e mordida na perna), acrescidos de recuo e mordida na mandíbula. Os dados foram estruturados em matrizes para o cálculo do David's Score (DS; Gammell et al., 2003). A imobilização foi excluída do cálculo por envolver múltiplos indivíduos. Com o DS normalizado (nDS), aplicou-se o algoritmo K-means (Chourbaji et al., 2005) ($k=3$) para categorizar as operárias em Alta, Média e Baixa Hierarquia (esta última incluindo indivíduos sem interações agonísticas registradas), seguindo a estrutura tripartite descrita para a espécie (Monnin & Peeters, 1999).

Amostragem da Divisão de Tarefas

A alocação de tarefas foi quantificada pelo método de varredura (scan sampling; Altmann, 1974), avaliando-se o cuidado com a prole, manutenção do ninho, forrageio e comportamentos complementares. De cada colônia, observou-se uma representante por nível hierárquico: a fêmea de maior pontuação no nDS para a Alta Hierarquia e operárias sorteadas aleatoriamente no software R 4.5.2 (R Core Team, 2026) para as categorias Média e Baixa. As varreduras ocorreram ao longo de cinco dias nos mesmos três horários diários, com sete observações por hora a intervalos de 10 minutos (21 varreduras/dia por operária).

Análise Estatística

As análises foram conduzidas no software R 4.5.2 (nível de significância $\alpha = 0,05$). Das 1.080 varreduras originalmente programadas (12 operárias em quatro colônias), 12 foram descartadas por mortalidade de um indivíduo, totalizando 1.068 varreduras válidas. Para avaliar a variação na frequência das tarefas entre os níveis hierárquicos, ajustaram-se Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM) com distribuição binomial via pacote glmmTMB (Brooks et al., 2017), tendo o status hierárquico como efeito fixo e a identidade da colônia como efeito aleatório. O efeito da hierarquia foi testado por Razão de Verossimilhança (LRT). A distribuição dos resíduos foi inspecionada via pacote DHARMa (Hartig, 2024) e as comparações post-hoc entre pares foram realizadas com correção de Tukey pelo pacote emmeans (Lenth, 2024).

Resultados e Discussões

A frequência de execução dos comportamentos emDinoponera quadriceps variou significativamente em função do status hierárquico das operárias para cuidado com a prole ($x^2 = 63,77$; $gl = 2$; $p < 0,001$), manutenção do ninho ($x^2 = 11,95$; $gl = 2$; $p = 0,0025$) e forrageio ($x^2 = 133,05$; $gl = 2$; $p < 0,001$) (Figura 3). O cuidado com a prole foi predominantemente realizado por operárias de alta hierarquia (11,94% ± 4,57%), com frequência significativamente superior à das operárias de média (1,94% ± 1,60%, $p < 0,0001$) e baixa hierarquia (0,28% ± 0,28%, $p = 0,0004$). Para a manutenção do ninho, embora o efeito geral da hierarquia tenha sido significativo, a frequência foi baixa em todos os grupos (Baixa: 0,61% ± 0,35%; Média: 2,23% ± 1,20%; Alta: 0%), e a separação quase perfeita entre grupos (nenhuma operária de alta hierarquia realizou esse comportamento) inviabilizou comparações par a par confiáveis. Descritivamente, a

manutenção do ninho foi mais frequente entre operárias de média hierarquia, na direção prevista. O forrageio também apresentou efeito significativo na comparação entre os diferentes status hierárquico, mas foi observado quase exclusivamente em operárias de baixa hierarquia (12,93% das varreduras dessa categoria), sem registros em média ou alta hierarquia. Entretanto, essa ocorrência esteve concentrada em uma única formiga, enquanto as outras três operárias de baixa hierarquia não forragearam nenhuma vez (figura 3).

Discussão

Os dados do nosso estudo mostram que a divisão de tarefas emDinoponera quadricepsestá diretamente ligada ao nível hierárquico das operárias (Grainger et al., 2014). Cada grupo (Alta, Média e Baixa hierarquia) assume papéis bem definidos na organização social da colônia (Asher et al., 2013). O cuidado com a prole ficou concentrado nas operárias de alta hierarquia (11,94%). Esse resultado é condizente com o padrão comportamental observado para a espécie, onde fêmeas dominantes tendem a permanecer na região central do ninho (Monnin & Peeters, 1998). Manter-se no centro do ninho permite que essas formigas garantam seu status reprodutivo por meio de interações físicas e sinais químicos, controlando as subordinadas sem a necessidade de constantes interações agonísticas de alto custo (Monnin & Peeters, 1999).

Por outro lado, o forrageamento ocorreu exclusivamente entre as operárias de baixa hierarquia (12,93%). A atividade externa representa uma tarefa de alto risco devido à exposição a predadores e fatores ambientais adversos (Asher et al., 2013). Do ponto de vista adaptativo, alocar operárias subordinadas para o forrageamento preserva as fêmeas de maior valor reprodutivo dentro da segurança do ninho (Denis et al., 2008; Grainger et al., 2014). Observou-se ainda uma expressiva especialização individual, visto que quase a totalidade das atividades externas foi executada por uma única operária, evidenciando um padrão de especialização individual, acentuado entre as subordinadas (Asher et al., 2013). A manutenção do ninho esteve associada predominantemente às operárias de média hierarquia (2,23%), enquanto as fêmeas de alta hierarquia não realizaram essa atividade. A categoria de média hierarquia atua como um grupo funcional intermediário: seus indivíduos contribuem com a infraestrutura e a limpeza interna do ninho, sem assumir os riscos do ambiente externo (Grainger et al., 2014).Esses achados demonstram a eficiência da organização social em D. quadriceps. Em espécies caracterizadas pela ausência da casta de rainha e que dependem de disputas operária-operária para o estabelecimento do reprodutor, a hierarquia social funciona como um estruturador da divisão de trabalho, otimizando a alocação energética, reduzindo o conflito interno e assegurando a estabilidade da colônia (Monnin & Peeters, 1999; Grainger et al., 2014).

Conclusão

Em síntese, o presente estudo mostra que a hierarquia de dominância exerce um papel central na distribuição de tarefas em Dinoponera quadriceps, promovendo uma alocação comportamental bem definida entre as categorias de status hierárquico. Contudo, a plasticidade observada na execução das atividades reforça a natureza dinâmica da

organização social da espécie. Para expandir a compreensão desses arranjos comportamentais, estudos futuros devem contemplar a ampliação do tamanho amostral (N) e avaliar a estabilidade temporal da hierarquia.

Referências

Altmann, J. (1974). Observational study of behavior: sampling methods. Behaviour, 49(3), 227–267.

Araujo, C. Z., & Jaisson, P. (1994). Modes de fondation des colonies chez la fourmi sans reine Dinoponera quadriceps Santschi (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). Actes Coll. Insectes Sociaux, 9, 79–88.

Araujo, C. Z., Fresneau, D., & Lachaud, J.-P. (1988). Premiers résultats sur l'éthologie d'une fourmi sans reine: Dinoponera quadriceps. Actes Coll. Insectes Sociaux, 4, 149–155.

Asher, C. L., Nascimento, F. S., Sumner, S., & Hughes, W. O. H. (2013). Division of labour and risk taking in the dinosaur ant, Dinoponera quadriceps. Myrmecological News, 18, 121–129.

Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Mächler, M., & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. The R Journal, 9(2), 378–400.

Chourbaji, S., Zala, S. M., & Brandstätter, R. (2005). K-means clustering analysis in behavioral patterns. Journal of Neuroscience Methods, 149(1), 1–9.

Corbara, B., Lachaud, J. P., & Fresneau, D. (1986). Individual marking with codes in social insects. Insectes Sociaux, 33(3), 312–315.

Denis, D., Chameron, S., Costille, L., Pocheville, A., Châline, N., & Fresneau, D. (2008). Reproductive status and age-related behavioral changes in queenless ant workers. Ecological Entomology, 32(3), 289–295.

Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. Methods in Ecology and Evolution, 7(11), 1325–1330.

Gammell, M. P., de Vries, H., Jennings, D. J., Carlin, C. M., & Hayden, T. J. (2003). David's score: a method for calculating dominance rank in animal groups. Animal Behaviour, 65(3), 601–602.

Grainger, D. P., Asher, C. L., Jones, J. C., Nascimento, F. S., Sumner, S., & Hughes, W. O. H. (2014). Reproductive dominance and division of labor in the dinosaur ant Dinoponera quadriceps. Ethology, 120(11), 1073–1080.

Hartig, F. (2024). DHARMa: Residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models (R package version 0.4.7).

Lenth, R. V. (2024). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means (R package version 2.0.4).

Lima, R. L. C. de. (2023). Comportamento e hierarquia reprodutiva em Dinoponera gigantea (Perty, 1833) (Tese de Doutorado em Psicologia Experimental). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Martin, P., & Bateson, P. (1993). Measuring behaviour: an introductory guide. Cambridge University Press.

Monnin, T., & Peeters, C. (1998). Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant Dinoponera quadriceps. Animal Behaviour, 55(2), 299–306.

Monnin, T., & Peeters, C. (1999). Dominance hierarchy and reproductive conflicts among subordinates in a monogynous queenless ant. Behavioral Ecology, 10(3), 323–332.

R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Turner, J. F. et al. (2026). Evolution of queen-worker size dimorphism and social complexity in ants. Evolution, 80(2), 312–324.

Wilson, E. O. (1971). The Insect Societies. Cambridge: Harvard University Press.

Anexos

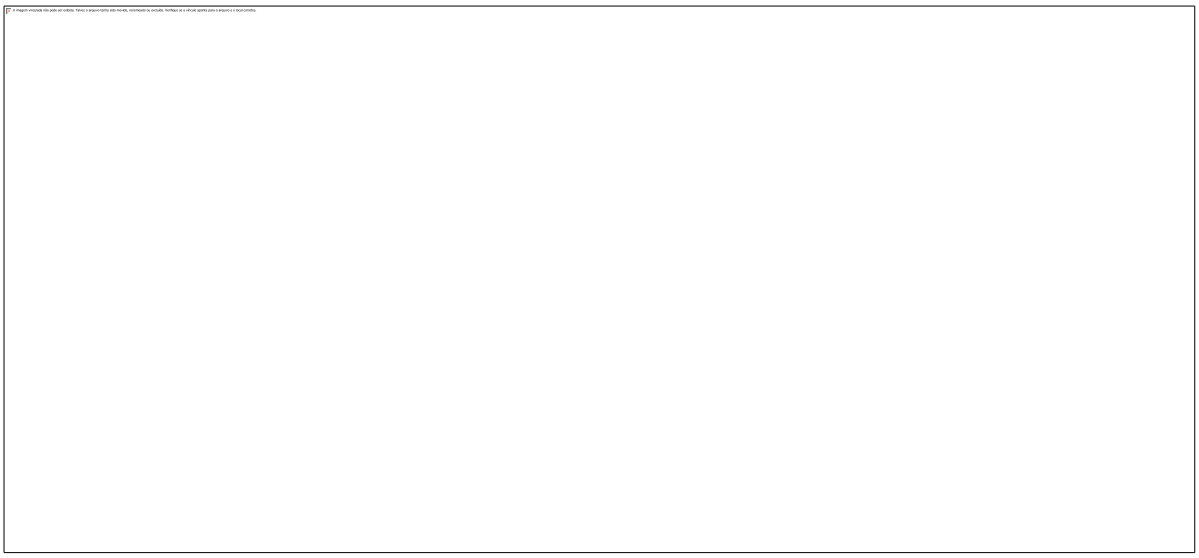


Figura 1. Arena de um metro quadrado forrada com vermiculita e revestida por laminado de fórmica com arena ao centro (Imagem do autor 2026).



Figura 2. D. quadriceps marcada com canetas coloridas atóxicas e placa com código exclusivo A7 (imagem do autor 2026).

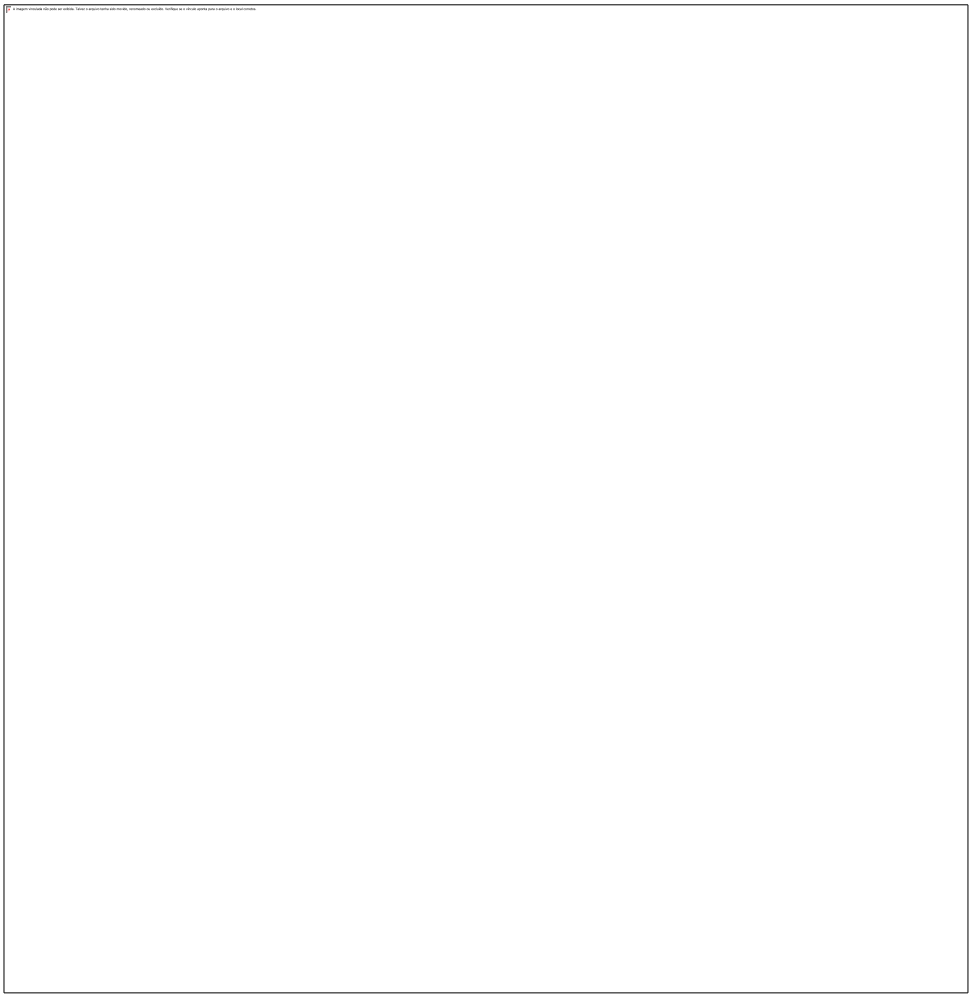


Tabela 1. Descrição dos comportamentos registrados, categorizados em agonísticos, cuidado com a prole e divisão de tarefas.

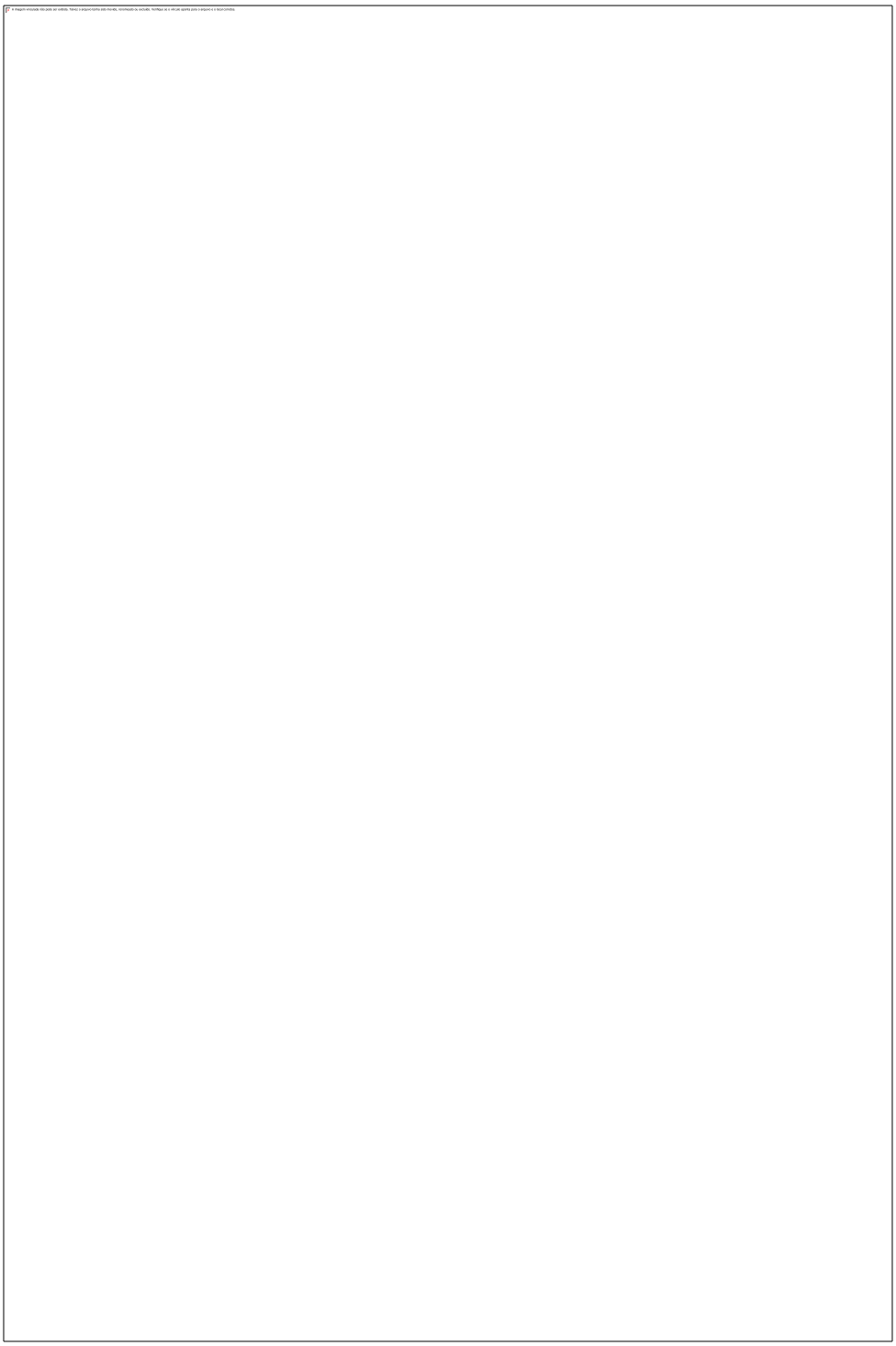


Tabela 1. Descrição dos comportamentos registrados, categorizados em agonísticos, cuidado com a prole e divisão de tarefas.

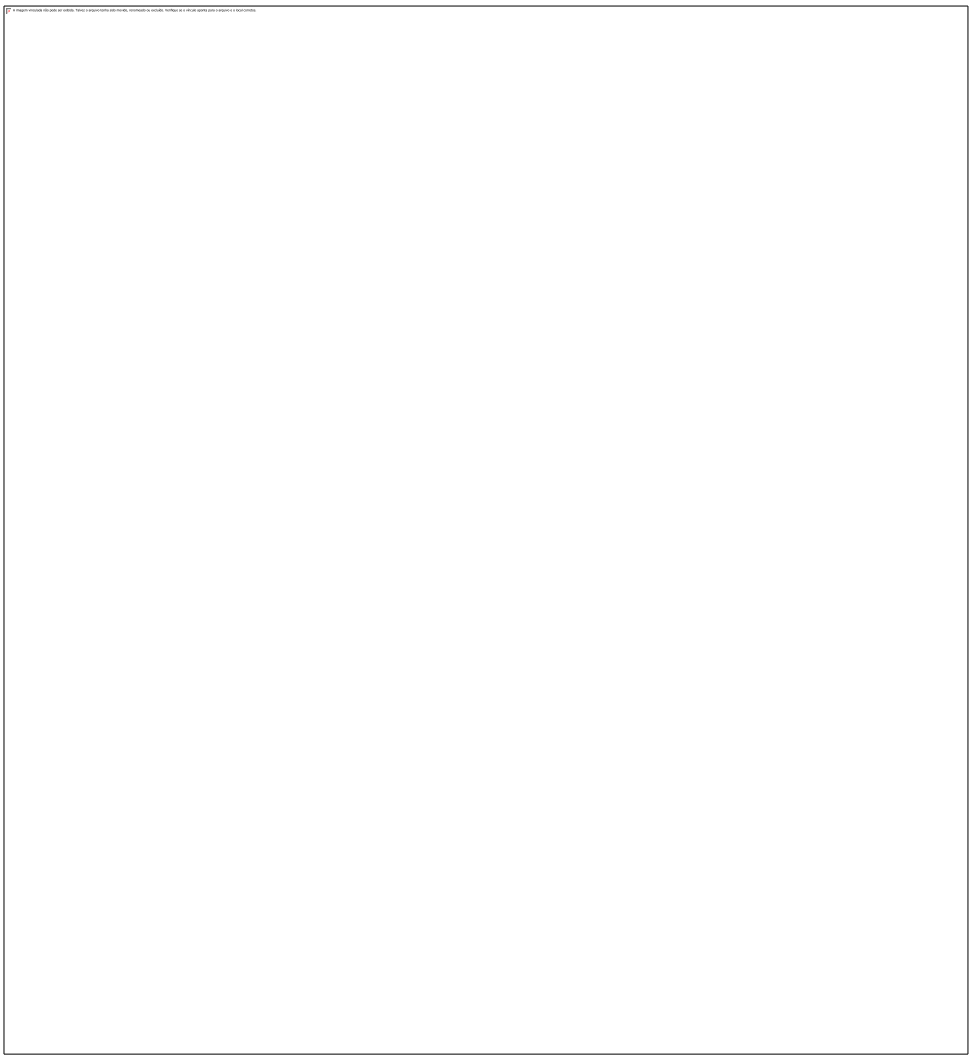


Tabela 1. Descrição dos comportamentos registrados, categorizados em agonísticos, cuidado com a prole e divisão de tarefas.

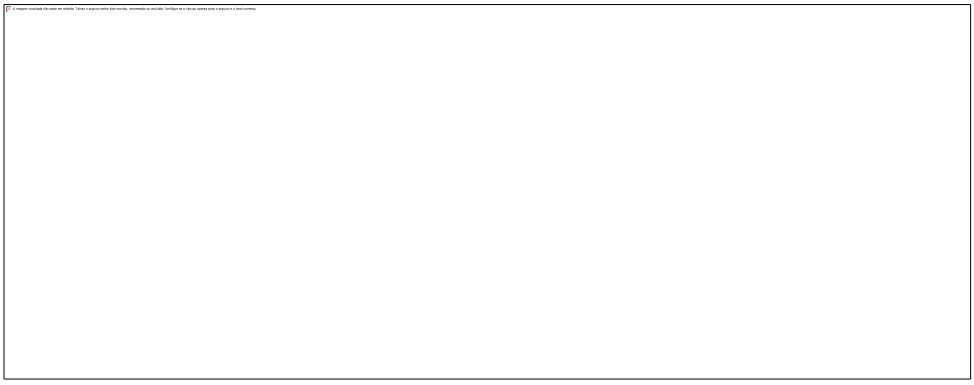


Figura 3 ilustra a divisão de trabalho entre as categorias hierárquicas (Baixa, Média e Alta) nas tarefas de forrageio, manutenção do ninho e cuidado com a prole, com frequências expressas por raiz quadrada. As barras indicam as médias

CÓDIGO: HS1620

AUTOR: JULIANA SANTOS COSTA

COAUTOR: IGOR ELOI MOREIRA

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Neurotransmissores em Formigas: Mapeamento Sistemático da Presença, Modulação Farmacológica e Respostas Comportamentais

Resumo

Os neurotransmissores regulam a flexibilidade comportamental, todavia seu impacto sobre a divisão de trabalho em formigas permanece pouco claro. Foi conduzida uma revisão sistemática com meta-análise para caracterizar a distribuição de pesquisa entre neurotransmissores, identificar associações consistentes entre neuroquímicos e comportamentos, e avaliar se a heterogeneidade entre estudos reflete variação biológica ou artefatos metodológicos. A literatura mostrou-se concentrada em três aminas biogênicas, octopamina, dopamina e serotonina, cuja proeminência reflete acessibilidade metodológica e não a biológica estabelecida, já neuropeptídeos e neurotransmissores de ação rápida foram pouco estudados. Os efeitos relatados foram consistentes dentro de várias categorias comportamentais, com neurotransmissores facilitando consistentemente locomoção, reprodução, cuidado com a prole e dominância, e inibindo de forma mais consistente reconhecimento e aprendizagem. A síntese quantitativa revelou heterogeneidade extrema entre estudos, impedindo uma estimativa geral combinada significativa; estudos com amostras maiores relataram consistentemente tamanhos de efeito menores, padrão compatível com efeitos de estudos pequenos. Esses achados estabelecem uma referência quantitativa para o campo e apontam a necessidade de ampliar o escopo neuroquímico, padronizar o relato estatístico e garantir amostragem adequada em nível de colônia em estudos futuros de neuroetologia de formigas.

Palavras-chave: Aminas biogênicas. Divisão de trabalho. Tamanho de efeito. Formicidae.

TITLE: WHAT DO NEUROTRANSMITTERS DO IN ANTS? A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Abstract

Neurotransmitters regulate behavioral flexibility, yet their impact on division of labor in ants remains poorly understood. A systematic review with meta-analysis was conducted to characterize the distribution of research across neurotransmitters, identify consistent associations between neurochemicals and behaviors, and assess whether heterogeneity across studies reflects biological variation or methodological artifacts. The literature was found to be concentrated on three biogenic amines, octopamine, dopamine, and serotonin, whose prominence reflects methodological accessibility rather than established biological relevance, whereas neuropeptides and fast-acting neurotransmitters were understudied. Reported effects were consistent within several behavioral categories, with neurotransmitters consistently facilitating locomotion, reproduction, brood care, and dominance, and more consistently inhibiting recognition and learning. The quantitative synthesis revealed extreme heterogeneity across studies, precluding a meaningful pooled overall estimate; studies with larger sample sizes consistently reported smaller effect sizes, a pattern consistent with small-study effects. These findings establish a quantitative benchmark for the field and point to the need for broadening neurochemical scope, standardizing statistical reporting, and ensuring adequate colony-level sampling in future ant neuroethology studies.

Keywords: Biogenic Amines. Division of labor. Effect size. Heterogenity. Formic

Introdução

As formigas figuram entre os insetos ecologicamente dominantes onde ocorrem, com estimativas de que sua biomassa combinada rivaliza ou supera a de todos os demais artrópodes terrestres (Tuma; Eggleton; Fayle, 2020). Seu sucesso ecológico é amplamente atribuído à organização eussocial, que combina cuidado cooperativo com a prole, gerações sobrepostas e divisão reprodutiva do trabalho, na qual apenas um ou poucos indivíduos se reproduzem enquanto os demais executam tarefas não reprodutivas (Hölldobler; Wilson, 1990; Nowak; Tarnita; Wilson, 2010). Sobre essa especialização reprodutiva se sobrepõe uma divisão de trabalho não reprodutiva altamente estruturada entre as operárias estéreis, o polietismo, orquestrada em parte pelo tamanho físico (polimorfismo, com subcastas menor, média e maior associadas a tarefas distintas) e em parte pela idade de desenvolvimento (polietismo temporal): indivíduos jovens desempenham tarefas intranidais, como cuidado da prole e da rainha, antes de amadurecer para funções extranidais de maior risco, como defesa do ninho e forrageio ativo. Subjacente a essas transições comportamentais existe uma química neural diversa. A pesquisa em neuroetologia de insetos tem se concentrado historicamente em aminas biogênicas: dopamina (Friedman et al., 2018), serotonina (Vleugels; Verlinden; Vanden Broeck, 2015) e octopamina (Farooqui, 2007), que modulam alocação de tarefas , interações sociais (Gordon, 1999) e sensibilidade olfativa (Ab Majid et al., 2018) em diversas espécies. Essas aminas não são, porém, as únicas moléculas neuroativas relevantes: o GABA (inibitório) e o glutamato (excitatório) apresentam variações significativas de concentração entre castas e estágios de desenvolvimento, e neuropeptídeos como o sNPF e a família PBAN/pirocinina adicionam uma camada adicional de regulação endócrina, sensível ao estado nutricional e à atividade de forrageio e cuidado com a prole (Wnuk et al., 2014). Apesar dessa diversidade neuroquímica, a literatura primária segue fragmentada, sem síntese abrangente disponível. Um problema metodológico raramente reconhecido de forma explícita agrava essa dificuldade de síntese: a unidade efetiva de replicação biológica em pesquisas com insetos sociais é a

colônia, não o indivíduo (Lynch et al., 2025). Operárias de uma mesma colônia compartilham background genético, ambiente de desenvolvimento e experiência social, de modo que medidas em nível individual não são estatisticamente independentes. Quando estudos tratam formigas individuais como réplicas independentes sem considerar a estrutura de colônia, os tamanhos de efeito relatados podem estar sistematicamente inflados, uma forma de pseudorreplicação (Hulbert, 1984) com consequências diretas para a interpretação das evidências pelo próprio campo. Não havia, até então, avaliação formal de quão disseminado é esse problema na neuroetologia de formigas. Diante dessas lacunas, o estudo conduziu uma revisão sistemática com meta-análise complementar sobre a função de neurotransmissores em formigas, com quatro objetivos: (1) testar se a frequência de estudo é desigual entre neurotransmissores, com predomínio de aminas biogênicas; (2) testar se a direção dos efeitos relatados é consistente dentro de categorias comportamentais amplas; (3) testar se o tamanho de efeito varia sistematicamente entre categorias comportamentais; e (4) testar se estudos menores relatam tamanhos de efeito desproporcionalmente maiores, um padrão compatível com efeitos de estudos pequenos e publicação seletiva de resultados positivos.

Metodologia

A revisão seguiu as diretrizes PRISMA, sem protocolo pré-registrado. A busca foi realizada na base Scopus em novembro de 2024, combinando os termos (ant OR ants OR Formicidae) AND (neuro* OR synap* OR neurotransmitter OR neuromodulation OR dopamine OR serotonin OR octopamine OR acetylcholine OR GABA OR glutamate), retornando 2314 registros. Foram incluídos artigos revisados por pares, em inglês, com informação qualitativa ou quantitativa sobre neurotransmissores e comportamento ou alocação de tarefas em formigas. Foram excluídos revisões, meta-análises, capítulos de livro, estudos com táxons não formicídeos, aplicações computacionais e artigos em outros idiomas. Os registros foram exportados em BibTeX e triados no Rayyan©, com leitura independente de títulos e resumos por todos os autores, avaliação de texto completo dos elegíveis e arbitragem de divergências por um terceiro autor. Após remoção de duplicatas e triagem (63 artigos), restaram 58 artigos incluídos (Figura 1). Para cada artigo foram extraídos: identidade taxonômica, casta, neurotransmissor e grupo químico (amina biogênica, aminoácido livre ou neuropeptídeo), receptor-alvo, correlato comportamental, direção do efeito (facilitação ou inibição), substância administrada, via de administração, método de preparo do tecido, método de mensuração, estrutura anatômica analisada e correlação com traços morfológicos. Para os estudos elegíveis à síntese quantitativa, foram extraídos ainda tamanhos amostrais por grupo (indivíduos e colônias separadamente), médias, desvios-padrão, erros-padrão e estatísticas de teste conversíveis. Os 50 correlatos comportamentais distintos foram agrupados em 10 categorias funcionais: Agressão/Defesa; Forrageio/Alimentação; Dominância/Divisão de trabalho; Locomoção/Atividade; Reprodução; Cuidado com a prole; Grooming; Aprendizagem; Reconhecimento; e Relacionado a drogas. A diferença de frequência de estudo entre neurotransmissores foi testada com o teste Q de Cochran (por permitir que um mesmo artigo contribua para múltiplos neurotransmissores), seguido de comparações par a par por McNemar com correção de Bonferroni. A proporção entre estudos descritivos e experimentais foi avaliada por teste binomial exato, e a distribuição das vias de administração por teste qui-quadrado com simulação de Monte Carlo. Os tamanhos de efeito foram calculados como g de Hedges (diferença média padronizada corrigida para viés de pequena amostra) via pacote metafor, com conversões algébricas para

comparações que forneciam apenas estatísticas t, F ou U de Mann–Whitney. Os efeitos foram combinados em modelo de efeitos aleatórios, com heterogeneidadereportada como τ^2 e I^2. Categoria comportamental e delineamento do estudo foram testados como moderadores em modelos de efeitos mistos (teste QM de Wald). O efeito de tamanho amostral (pequenos-estudos) foi testado por meta-regressão com número de indivíduos e de colônias (log-transformados) como preditores simultâneos, e o viés de publicação avaliado pelo teste de Egger e pelo método trim-and-fill.

Resultados e Discussões

O conjunto de dados reuniu 243 achados extraídos de 58 artigos. A grande maioria dos estudos enfoca aminas biogênicas (53 de 58 artigos), contra apenas cinco sobre neuropeptídeos. Octopamina e dopamina foram cada uma estudada em 31 artigos, seguidas de serotonina (23) e tiramina (10); os demais neurotransmissores (GABA, sNPF, acetilcolina, CCAP, NPA e pirocinina b) apareceram em três ou menos artigos cada (Figura 2). Essa distribuição foi altamente não uniforme (Q de Cochran = 167,64; gl = 9; $p < 2{,}2\times10^{-16}$), e as comparações par a par confirmaram que octopamina e dopamina foram estudadas com frequência significativamente maior que GABA, sNPF e os neurotransmissores de artigo único, sem diferença significativa entre octopamina, dopamina e serotonina, a tríade dominante do campo. Octopamina foi o neurotransmissor mais amplamente estudado, com associações em nove das dez categorias comportamentais, sobretudo forrageio/alimentação (13 artigos) e agressão/defesa (12). Dopamina associou-se principalmente a agressão/defesa (12) e reprodução (5); serotonina, a agressão/defesa (10) e forrageio/alimentação (6). Dos 243 achados, 144 apresentavam direção de efeito registrada: 75% positivos e 25% negativos. Os efeitos mais consistentemente positivos (facilitadores) ocorreram em locomoção/atividade (REML) e (100%), reprodução (91%), cuidado com a prole (91%) e dominância/divisão de trabalho (90%); já reconhecimento (83% negativo) e aprendizagem (75% negativo) mostraram-se predominantemente inibitórios. Agressão e forrageio apresentaram resultados mistos, refletindo maior diversidade de espécies e contextos experimentais. Quanto à abordagem experimental, os estudos dividiram-se de forma equilibrada entre quantificação endógena de neurotransmissores (33 artigos) e manipulação experimental (32), sem desvio significativo da paridade ($p = 0{,}51$). Entre os que manipularam, a via oral predominou amplamente (63%), seguida de aplicação tópica (7)+ e injeção (6), distribuição altamente não uniforme ($\chi^2 = 23{,}18$; $p < 0{,}0001$). Da amostra total, apenas 13 comparações de nove estudos forneceram dados suficientes para cálculo de tamanho de efeito; 25 comparações restantes entraram na síntese por contagem de votos. O modelo de efeitos aleatórios combinando as 13 comparações (dopamina, serotonina, octopamina e GABA) produziu efeito global não significativo ($g = 0{,}09$; $p = 0{,}84$), com heterogeneidade extrema ($I^2 = 97{,}5\%$; $\tau^2 = 2{,}24$; $Q(12) = 454{,}62$; $p < 0{,}0001$), a estimativa combinada não é biologicamente interpretável isoladamente. A categoria comportamental não foi moderadora significativa ($QM(8) = 10{,}38$; $p = 0{,}24$); apenas locomoção/atividade apresentou estimativa significativamente diferente de zero ($g = 4{,}65$; $p = 0{,}017$), derivada porém de um único estudo, o que exige cautela na interpretação. A meta-regressão conjunta com número de indivíduos e de colônias (log-transformados) foi significativa ($QM(2) = 10{,}54$; $p = 0{,}005$; $R^2 = 44{,}1\%$), com inclinações negativas para ambos os preditores (indivíduos: $\beta = -1{,}27$, $p = 0{,}017$; colônias: $\beta = -1{,}80$, $p = 0{,}013$): estudos com mais indivíduos e mais colônias relataram consistentemente efeitos menores. Isoladamente, nenhum dos dois preditores foi significativo, sugerindo colinearidade entre

as duas dimensões amostrais. Esse padrão é compatível com efeitos de estudos pequenos, reforçado pela assimetria significativa do funil de publicação (teste de Egger: z = 2,34; p = 0,019), ainda que o método trim-and-fill não tenha estimado estudos ausentes , provavelmente por conta da heterogeneidade extrema, que quebra o pressuposto de simetria do método.

Conclusão

A revisão e meta-análise de 243 achados provenientes de 58 estudos revelam um campo fortemente concentrado em três aminas biogênicas, cuja proeminência decorre de acessibilidade metodológica histórica e não de importância biológica estabelecida. Os efeitos relatados são direcionalmente consistentes dentro de várias categorias comportamentais, facilitando locomoção, reprodução, cuidado com a prole e dominância, e inibindo reconhecimento e aprendizagem, mas a heterogeneidade entre estudos é grande demais para sustentar um efeito combinado único biologicamente significativo. Estudos com menor número de colônias, a unidade de replicação biologicamente apropriada em insetos sociais, tenderam a relatar tamanhos de efeito maiores, evidência de efeitos de estudos pequenos que provavelmente inflacionam a magnitude aparente dos efeitos neuroquímicos na literatura. Em nossa interpretação, é recomendado a expansão do escopo neuroquímico para além da tríade octopamina-dopamina-serotonina, o relato padronizado de tamanhos amostrais em nível de indivíduo e de colônia, a incorporação da identidade da colônia como efeito aleatório em modelos mistos, e a adoção de métricas comportamentais quantitativas padronizadas que permitam comparação e agregação entre estudos futuros.

Referências

AB MAJID, Abdul Hafiz et al. Olfactory behavior and response of household ants (Hymenoptera) to different types of coffee odor: A coffee-based bait development prospect. Journal of Asia-Pacific entomology, v. 21, n. 1, p. 46–51, 2018. FAROOQUI, Tahira. Octopamine-Mediated Neuromodulation of Insect Senses. Neurochemical Research, v. 32, n. 9, p. 1511–1529, 1 set. 2007. FRIEDMAN, Daniel A. et al. The role of dopamine in the collective regulation of foraging in harvester ants. iScience, v. 8, p. 283–294, 2018. GORDON, D. M. Interaction patterns and task allocation in ant colonies. In: DETRAIN, C.; DENEUBOURG, J. L.; PASTEELS, J. M. (Orgs.). Information Processing in Social Insects. Basel: Birkhäuser Verlag, 1999. p. 51–68. HÖLLDOBLER, Bert; WILSON, Edward O. The Ants. Cambridge: Belknap Press, 1990. HULBERT, J. Pseudoreplication and the design of field experiments in ecology. Ecological Monographs, v. 54, p. 187–211, 1984. LYNCH, Colin M. et al. More individuals or more groups? Incorporating sampling effort, statistical power, and model accuracy when designing experiments. Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 79, n. 11, p. 106, 9 out. 2025. NOWAK, Martin A.; TARNITA, Corina E.; WILSON, Edward O. The evolution of eusociality. Nature, v. 466, n. 7310, p. 1057–1062, ago. 2010. TUMA, Jiri; EGGLETON, Paul; FAYLE, Tom M. Ant-termite interactions: an important but under-explored ecological linkage. Biological Reviews, v. 95, n. 3, p. 555–572, 2020. VLEUGELS, Rut; VERLINDEN, Heleen; VANDEN BROECK, Jozef. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. Neurotransmitter, v. 2, p. e314, 2015.

WNUK, Andrzej et al. Brain GABA and glutamate levels in workers of two ant species (Hymenoptera: Formicidae): Interspecific differences and effects of queen presence/absence. Insect Science, v. 21, n. 5, p. 647–658, 2014.

Anexos

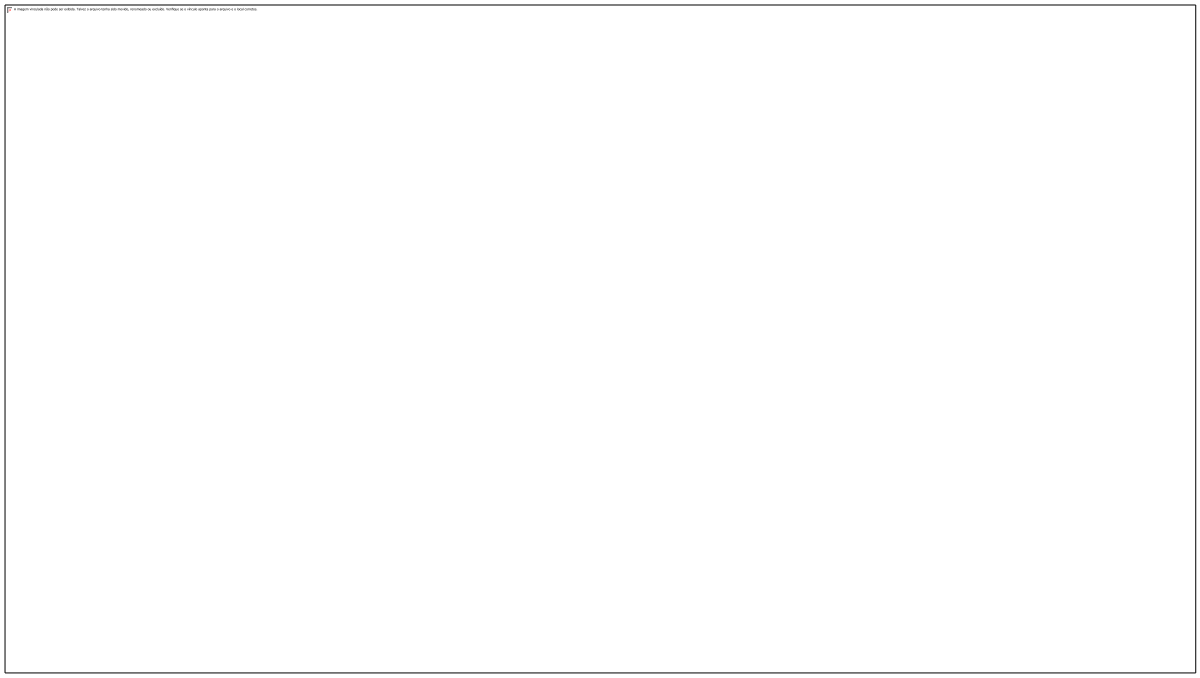


Figura 1 - Fluxograma do processo de busca, seleção, elegibilidade e extração de dados dos artigos analisados na revisão (Autoria própria, 2026).



Figura 2 - Evolução temporal da publicação de artigos científicos categorizada pelo grupo químico dos compostos neuroativos investigados (Autoria própria, 2026).

CÓDIGO: HS1677

AUTOR: ELLEN ABIGAIL LIMA DE SOUSA

COAUTOR: KAREN CRISTINA PUGLIANE

ORIENTADOR: JOHN FONTENELE ARAUJO

TÍTULO: WAKE-UP!: Dinâmica da Glicêmica Matinal e Ritmicidade Repouso-Atividade no Fenômeno do Alvorecer

Resumo

A caracterização do Fenômeno do Alvorecer em vida livre exige a identificação fidedigna do despertar biológico e sua integração à ritmicidade circadiana. Este estudo objetivou avaliar a cinética glicêmica matinal e sua relação com o ritmo atividade-repouso no diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Monitoraram-se 50 participantes (37 com DM2 e 13 controles; 554 ciclos matinais) por sensores contínuos de glicose e actigrafia multissensorial. Para isso, desenvolveu-se o algoritmo multissensorial WAKE-UP, que estimou o despertar biológico (T_0) por fusão motor-térmica, apresentando alta concordância com diários de sono (erro mediano: 14,6 min; 80,2% de acerto em ±30 min). A cinética pós-despertar (180 min) foi analisada por $iAUC_{3h}$, taxa máxima de ascensão ((dG/dt)max), Sparse FPCA e GEE/HC3. Ancorado ao WAKE-UP, o grupo DM2 apresentou maior exposição glicêmica (mediana: 6.764 vs. 1.237 mg/dL·min; $p < 0,0001$; $\beta = +5.831,3$) e velocidade instantânea (1,25 vs. 0,51 mg/dL/min; $p = 0,0089$). A análise funcional revelou que o DM2 associa-se a maior magnitude e persistência da curva (FPC1, $p < 0,0001$), sem alteração na sincronização temporal (FPC2, $p = 0,847$). No modelo multivariado aditivo, a Variabilidade Intradiária (IV) associou-se inversamente à $iAUC_{3h}$ ($\beta = -6.716,4$; $p = 0,0324$). Conclui-se que o WAKE-UP fornece ancoragem biológica precisa e que rotinas com maior alternância motora associam-se a menor magnitude da excursão glicêmica matinal no DM2.

Palavras-chave: Fenômeno do Alvorecer. Ritmo circadiano. Diabetes tipo 2. Actigrafia.

TITLE: WAKE-UP: Dynamics of Morning Glycemic Excursion and Rest-Activity Rhythmicity in the Dawn Phenomenon

Abstract

Accurate characterization of the Dawn Phenomenon in free-living conditions requires reliable identification of biological awakening and integration with circadian rhythmicity. This study evaluated morning glycemic kinetics and its relationship with the activity-rest rhythm in type 2 diabetes (T2DM). Fifty participants (37 T2DM, 13 controls; 554 morning cycles) were monitored using continuous glucose sensors and multisensor actigraphy. The multisensor WAKE-UP algorithm was developed to estimate biological awakening (T_0) via motor-thermal fusion, showing high concordance with sleep diaries (median error: 14.6 min; 80.2% accuracy within ±30 min). Post-awakening kinetics (180 min) were analyzed via $iAUC_{3h}$, maximum rate of rise ((dG/dt)max), Sparse FPCA, and GEE/HC3. Anchored to WAKE-UP, the T2DM group presented higher glycemic exposure (median: 6,764 vs. 1,237 mg/dL·min; $p < 0.0001$; $\beta = +5,831.3$) and instant rate of rise (1.25 vs. 0.51 mg/dL/min; $p = 0.0089$). Functional analysis revealed that T2DM was associated with greater curve magnitude and persistence (FPC1, $p < 0.0001$), without changes in temporal synchronization (FPC2, $p = 0.847$). In the additive multivariate model, Intradaily Variability (IV) was inversely associated with $iAUC_{3h}$ ($\beta = -6,716.4$; $p = 0.0324$). In conclusion, WAKE-UP provides precise biological anchoring, and daily routines with higher motor alternation are associated with lower morning glycemic excursion in T2DM.

Keywords: Dawn Phenomenon. Circadian Rhythm. Type 2 Diabetes. Actigraphy.

Introdução

O metabolismo glicêmico é integrado a uma complexa rede circadiana, na qual osciladores endógenos e pistas externas (zeitgebers), como o ciclo claro-escuro e a alimentação, coordenam as flutuações da glicemia e a secreção rítmica de hormônios regulatórios que modulam a produção hepática de glicose, a sensibilidade à insulina e a captação periférica tecidual (Qian e Scheer, 2016; Poggiogalle et al., 2018). A dessincronia entre comportamentos (sono irregular, alimentação tardia) e essa temporização biológica gera desalinhamento circadiano (Wittmann et al., 2006; Roenneberg et al., 2012; Mason et al., 2020), fazendo o aporte nutricional coincidir anormalmente com a secreção elevada de melatonina. Essa dessincronização prejudica a regulação metabólica antecipatória, favorecendo um estado diabetogênico caracterizado pela progressão da intolerância à glicose e da insensibilidade insulínica (Morris et al., 2015; Cipolla-Neto e Amaral, 2018).

Essa perda de antecipação homeostática reflete-se no Fenômeno do Alvorecer (FA), que representa o aumento fisiológico na demanda de insulina ou na glicemia matinal (Schmidt et al., 1981; Bolli e Gerich, 1984), manifestando-se de forma exacerbada no Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) (Monnier et al., 2013). Durante o sono, a ação da melatonina e a menor demanda tecidual mantêm a glicemia estável sob baixa secreção insulínica (Cipolla-Neto e Amaral, 2018). Na transição para o despertar, contudo, a elevação do cortisol e a estimulação autonômica aceleram a produção hepática de glicose como preparação para a vigília (Poggiogalle et al., 2018; Peng et al., 2022). Sob desalinhamento circadiano e DM2, combinam-se a resistência insulínica matinal (que estimula a hiperprodução hepática de glicose) e o prejuízo funcional das células beta, resultando em

hiperglicemia matinal prolongada e hiperatividade simpática (Carroll e Schade, 2005; Peng et al., 2022).

Historicamente, a quantificação da magnitude do FA dependia da identificação exata do nadir glicêmico noturno, aferição limitada pelo automonitoramento capilar intermitente (Carroll e Schade, 2005; Monnier et al., 2013). O monitoramento contínuo de glicose (CGM) superou essa barreira ao fornecer leituras intersticiais de alta resolução temporal, viabilizando métricas dinâmicas como a taxa instantânea de variação (dG/dt) (Kovatchev et al., 2005) e a área incremental sob a curva ($iAUC_{3h}$) para mensurar a exposição metabólica cumulativa (Barua et al., 2022). Contudo, a avaliação em janelas pré-fixadas de relógio (por exemplo, da meia-noite ao desjejum) desconsidera a variabilidade do ciclo sono-vigília, dissociando a análise da fisiologia circadiana e mascarando a excursão glicêmica real (Barua et al., 2024).

Para preencher essa lacuna metodológica, propusemos o algoritmo multissensorial WAKE-UP, ancorado na estimativa do despertar fisiológico, para caracterizar a dinâmica da excursão glicêmica matinal e sua relação com a ritmicidade do ciclo atividade-repouso no Fenômeno do Alvorecer em indivíduos com DM2 e controles normoglicêmicos. Partimos da hipótese de que a ancoragem no despertar biológico, ao reduzir o viés de subestimativa típico de horários fixos, permite captar com maior fidelidade a associação entre a fragmentação do ritmo de atividade-repouso e a gravidade do escape glicêmico matinal no DM2.

Metodologia

2.1. Desenho do Estudo e Aspectos Éticos

Este estudo foi uma análise de dados longitudinais de dois protocolos independentes de monitoramento multimodal (actimetria e CGM) nos grupos Clínico (DM2) e Controle (estudantes universitários). A pesquisa foi aprovada pelos CEPs da EMCM-RN (CAAE 59134222.0.0000.5568) e UFRN (CAAE 60610322.7.0000.5537). O recrutamento ocorreu (DM2: março a agosto/2024; Controle: junho/2025) em Caicó e Natal (RN, Brasil), municípios a 5° de latitude sul, com fotoperíodo estável (12,11±0,23h) e baixa variação sazonal (Pugliane et al., 2026).

2.2. Participantes e Critérios de Elegibilidade

A amostragem foi por conveniência, sendo 70 participantes: 48 DM2, 22 Controle. O controle de qualidade excluiu 20 voluntários (28,6%): 11 no DM2 (monitoramento insuficiente) e 9 no Controle (2 diabetes prévio, 1 falha instrumental, 6 monitoramento insuficiente). O monitoramento insuficiente foi definido como <10 dias de registro simultâneo de actimetria e CGM, requisito mínimo para estimativas estáveis (Refinetti et al., 2007; Pugliane et al., 2026).

2.3. Protocolo de Monitorização Multimodal

Actímetros ActTrust 1 (Condor Instruments) registraram atividade motora, exposição à luz e temperatura periférica (pulso não dominante), minuto a minuto, por até 30 dias. A glicose intersticial foi monitorada por até 14 dias pelo sistema FreeStyle Libre (Abbott Diabetes Care) com leituras a cada 15 min.

2.4. Processamento de Sinais, Máscara PISA e Estimação do Despertar

No pré-processamento do CGM, filtraram-se artefatos de atenuação por pressão (PISA), adaptado de Baysal et al. (2014) à resolução de 15 min, identificando oscilações abruptas (variação ≥30 mg/dL) associadas a falsas hipoglicemias (<70 mg/dL) centradas em 45 min contínuos. Lacunas de até 30 min foram tratadas por interpolação linear (Fonda et al., 2013) e falhas de 30–120 min por PCHIP (Rehman et al., 2024; Cichosz et al., 2025). Dias com perdas superiores a 120 min ou menos de 75% de pontos válidos na janela matinal de 3h pós-despertar foram descartados. O despertar biológico (T_0) foi estimado pelo algoritmo multissensorial WAKE-UP, acoplando inércia motora (van Hees et al., 2018) à queda de temperatura periférica (média móvel de 30 min) via Índice Termo-Atividade, rejeitando noctúrias e microdespertares. Para benchmarking, o WAKE-UP (M4) foi comparado a: (M1) método fixo (07h00); (M2) CircaCP (Chen e Sun, 2024), unissensorial, por ponto de mudança na atividade motora; e (M3) Fusão Termo-Actimétrica com Savitzky-Golay (FTA-SG), bimodal (mesmos canais do M4), inspirada em Ortiz-Tudela et al. (2010), diferindo na suavização térmica (Savitzky-Golay vs. média móvel de 30 min) e na tolerância de defasagem motor-térmica. O WAKE-UP foi validado às cegas contra diários de sono do Controle via Bland-Altman.

2.5. Métricas Circadianas, Jetlag Social e Modelagem Funcional (FDA)

A Estabilidade Interdiária (IS) e a Variabilidade Intradiária (IV) foram calculadas por NPCRA (análise não paramétrica de ritmos), sobre séries horárias de atividade motora (pyActigraphy; Witting et al., 1990; Van Someren et al., 1997; Hammad et al., 2021). O jetlag social foi quantificado pelo deslocamento do ponto médio das cinco horas de menor atividade (L_5) entre dias de trabalho e folga (Wittmann et al., 2006), conforme calendário estadual. Foram analisados os questionários MEQ, MCTQ, PSQI, ISI, Berlim, ESS e IPAQ (cronotipo, jetlag social, qualidade do sono, gravidade da insônia, risco de apneia, sonolência diurna e atividade física) de ambos os grupos. Devido à amostragem discreta, as trajetórias glicêmicas (180 min pós-T_0) foram reconstruídas por FDA via B-splines cúbicas (7 funções de base; λ=0,5), preferida ao Cosinor de 24h por capturar a cinética não senoidal do alvorecer. Aplicou-se a Análise de Componentes Principais Funcionais Esparsos (Sparse FPCA; Gecili et al., 2021), 80/20 treino-teste por participante, retendo FPC_1 e FPC_2, que sumarizam magnitude e cinética da excursão. A taxa máxima de ascensão glicêmica, expressa por (dG/dt)max (em mg/dL/min), foi obtida como o máximo da primeira derivada das B-splines, refletindo a produção hepática de glicose, isolada de interferência alimentar pelo critério de parada em $dG/dt \leq 0$ (Carroll e Schade, 2005). A Área Incremental sob a Curva ($iAUC_{3h}$, em mg/dL·min) foi integrada em até três horas pós-despertar, ancorada na mediana dos 30 min prévios ao T_0; quando a glicemia atingia estabilização ($dG/dt \leq 0$ por 30 min) antes do fim dessa janela, a integração era interrompida precocemente.

2.6. Análise Estatística

As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney, adotado diante da violação da normalidade (Shapiro-Wilk) e da homocedasticidade (Levene), com tamanho do efeito mensurado pela correlação rank-biserial; variáveis categóricas (sexo) pelo teste exato de Fisher, com inferências bicaudais. A acurácia dos algoritmos de despertar foi validada pelo teste global de Friedman sobre o erro absoluto frente aos diários de sono (van Hees et al., 2018), seguido por Wilcoxon com correção de Bonferroni nas comparações pareadas (Demšar, 2006) e por Bland-Altman (1986) para concordância e limites clínicos de tolerância. Associações bivariadas entre ritmicidade e cinética metabólica foram avaliadas por correlação de Spearman. O volume de exposição matinal ($iAUC_{3h}$), com medidas repetidas, foi modelado por GEE (Equações de Estimação Generalizadas) com estrutura de correlação permutável, selecionada pelo menor QIC; a taxa máxima de ascensão, expressa por (dG/dt)max, foi modelada por regressão robusta HC3, com interação entre grupo clínico e ritmicidade (IS e IV). Ambos os modelos foram ajustados por idade e sexo, com VIF para multicolinearidade. Adotou-se $\alpha = 0,05$, com correção de Benjamini-Hochberg (FDR) para múltiplos testes nas análises principais. Executado em Python 3.12 (scikit-fda 0.10.1, scikit-learn 1.9.0, statsmodels 0.14.6, scipy 1.18.0).

Resultados e Discussões

3.1. Caracterização Clínico-Demográfica e Controle Longitudinal

A amostra final validada compreendeu 50 participantes (37 com DM2 e 13 estudantes normoglicêmicos), os quais totalizaram 554 ciclos matinais pareados entre o monitoramento contínuo de glicose (CGM) e a actimetria (412 ciclos no grupo DM2 e 142 no grupo Controle; Tabela 1). A análise demográfica registrou diferença etária entre as coortes (59,6±13,8 anos no grupo DM2 versus 20,1±1,7 anos no grupo Controle; $p < 0,001$; rrb=−0,985) e predomínio do sexo feminino no grupo clínico (86,5% versus 38,5%; p=0,0017). Essa distribuição alinha-se ao perfil epidemiológico nacional documentado pela Sociedade Brasileira de Diabetes (Rodacki et al., 2024) e pelo relatório Vigitel (2023), os quais registram maior prevalência autorrelatada da patologia em idosos e na população feminina (Figura 1).

Embora variações fisiológicas na sensibilidade periférica à insulina e na distribuição de adiposidade corporal tenham sido descritas na literatura geral entre homens e mulheres, o ajuste multivariado por sexo confirmou que a aceleração e o volume da excursão matinal decorrem do diabetes sem tendência por gênero (Tabela 3; Figura 9). Em virtude dessas disparidades basais, os modelos analíticos longitudinais subsequentes incorporaram o ajuste estatístico multivariado para ambas as covariáveis, reduzindo o confundimento pelos efeitos do envelhecimento e do sexo e aproximando as variações metabólicas observadas da fisiopatologia do DM2. Contudo, a ausência de sobreposição etária substancial entre as coortes (não idosos versus idosos) constitui uma limitação estrutural do desenho observacional e da técnica de amostragem. O ajuste estatístico atenua esse problema, mas não o elimina: a atribuição das diferenças glicêmicas exclusivamente ao diagnóstico de DM2, e não a processos biológicos correlacionados à idade, deve ser interpretada com cautela.

Os perfis de monitoramento de repouso-atividade com actogramas duplos de 48 horas (Figura 2) e a dinâmica da glicemia contínua com filtragem de artefatos de pressão (PISA) (Figura 3) passaram por inspeção individual para a detecção de lacunas instrumentais. O tempo total de monitoramento ambulatorial em vida livre foi equivalente entre os grupos (12,8±1,5 dias no DM2 versus 12,0±1,3 dias no Controle; p = 0,0502; rrb = −0,338). A análise de sensibilidade por modelos de regressão logística não revelou viés de seleção sistemática decorrente de eventuais perdas de captação.

3.2. Validação Algorítmica do Despertar

Para validar a ancoragem biológica a ser aplicada na coorte longitudinal (n = 554 ciclos), isolou-se uma subamostra de 101 ciclos matinais providos de pareamento simultâneo entre os biossensores e os diários de sono (padrão-ouro ecológico obtido no grupo controle), destinada exclusivamente à testagem de acurácia algorítmica. O teste global de Friedman confirmou diferenças significativas na acurácia das quatro estratégias de estimativa (n=99 ciclos com pareamento quádruplo completo; $X2(3)=98,01$; $p < 0,001$). O algoritmo multissensorial WAKE-UP (M4) registrou erro absoluto mediano (MedAE) de 14,6 minutos (IQR: 5,6 a 25,9 min; amplitude interquartil de 20,3 min) e viés médio de +4,3 minutos (Tabela Suplementar S1). Na análise post-hoc, o WAKE-UP apresentou menor deslocamento temporal frente ao método estático das 07h00 (M1; MedAE de 50,0 minutos; pBonferroni < 0,001) e superou estatisticamente o algoritmo unissensorial CircaCP (M2; Chen e Sun, 2024; pBonferroni = 0,0426), mantendo equivalência estatística frente à Fusão Termo-motora com Filtro de Savitzky-Golay (M3, FTA-SG), abordagem bimodal inspirada no princípio de integração multissensorial de Ortiz-Tudela et al. (2010; pBonferroni = 0,8125).

Ambos os modelos de fusão motor-térmica (M3 e M4) utilizam os mesmos dois canais físicos do ActTrust 1 (acelerômetro e placa térmica). Diferenciam-se apenas no operador de atenuação do ruído térmico (filtro polinomial de Savitzky-Golay no M3, contra média móvel de 30 minutos no M4) e na regra de concordância de defasagem temporal entre os sinais motor e térmico. Ademais, o WAKE-UP apresentou maior taxa de acerto na detecção do despertar dentro da janela de tolerância clínica de ±30 minutos, alcançando 80,2% de retenção de noites, contra 72,3% no FTA-SG (M3), 58,5% no CircaCP (M2) e apenas 21,6% no horário social fixo (M1; Tabela Suplementar S1). O alinhamento temporal autônomo e a distribuição do erro entre os métodos estão detalhados visualmente nas Figuras 4 e 5.

A identificação fidedigna da transição sono-vigília é determinante para a correta avaliação metabólica matinal, uma vez que a regulação endógena da glicose é sincronizada ao despertar biológico (Qian e Scheer, 2016). A adoção de um horário fixo de despertar no M1 introduziu um erro absoluto mediano próximo a uma hora (MedAE de 50,0 minutos), o que afetaria diretamente o cálculo da Área Incremental sob a Curva ($iAUC_{3h}$). Isso ocorre porque essa métrica avalia a exposição glicêmica subtraindo o valor basal identificado no exato instante do despertar (T_0) da área total acumulada, de modo que qualquer desalinhamento temporal distorce a linha de base do participante. Esse viés subestima a resposta metabólica intrínseca do organismo se o despertar estimado for registrado antes do real. Se, ao contrário, o cálculo for feito com atraso, ele incorpora indevidamente o efeito da alimentação do desjejum (Barua et al., 2022; Barua et al., 2024).

Da mesma forma, a taxa máxima de ascensão glicêmica ((dG/dt)max), utilizada para mensurar a velocidade do Fenômeno do Alvorecer (Kovatchev et al., 2005), é afetada por erros superiores a 30 minutos. Nesses cenários imprecisos, a medição incide sobre o período de estabilidade noturna ou sobre a rápida subida da glicose após a refeição, mascarando a dinâmica hormonal do amanhecer (Monnier et al., 2013). O método multissensorial proposto elimina a dependência dos diários de sono, naturalmente vulneráveis a falhas de memória e à subestimação de despertares noturnos (Ancoli-Israel et al., 2003), atendendo assim à necessidade de protocolos objetivos (van Hees et al., 2018). Isso permite que a quantificação da glicemia acompanhe, com maior precisão temporal, a janela biológica do despertar.

3.3. Comparação Clínica da Cinética Glicêmica

A quantificação da excursão glicêmica nos 180 minutos subsequentes ao despertar biológico (T_0) evidenciou elevação da exposição incremental no grupo com diabetes tipo 2. A Área Incremental sob a Curva ($iAUC_{3h}$) registrou mediana de 6.764 mg/dL·min no DM2, contra 1.237 mg/dL·min nos controles ($U = 430$; $p < 0,0001$; rrb = −0,788; Figura 6). A modelagem longitudinal por Equações de Estimação Generalizadas, com estrutura permutável de melhor ajuste validada pelo menor QIC (Tabela 2), indicou um acréscimo de +5.831,3 mg/dL·min associado ao diagnóstico clínico ($p < 0,0001$), sem associação estatisticamente significativa com idade ou sexo (Tabela 3 e Figura 7).

A decomposição matemática das trajetórias por Análise de Dados Funcionais (FDA) revelou uma ascensão sustentada na taxa de variação glicêmica do grupo com DM2 (Figura 8). A taxa máxima de ascensão ((dG/dt)max) atingiu mediana de 1,25 mg/dL/min, com pico entre 45 e 75 minutos pós-despertar, superando a mediana observada no grupo Controle (0,51 mg/dL/min; $U = 350,0$; $p = 0,0089$; rrb = −0,496; Tabela 4). A regressão linear múltipla robusta (HC3) indicou uma associação significativa entre o diabetes e a taxa de ascensão, com um acréscimo estimado de +0,714 mg/dL/min (IC 95%: +0,054 a +1,375), com efeito sustentado após o controle por idade e sexo ($p = 0,0340$; Figura 9).

O aumento da exposição incremental ($iAUC_{3h}$) e a taxa máxima de ascensão ((dG/dt)max) observados no DM2 são consistentes com a perda da resposta insulínica compensatória frente à sinalização de contrarregulação matinal. Em indivíduos normoglicêmicos, o incremento fisiológico da produção hepática de glicose no despertar é contrabalanceado por uma resposta secretória compensatória das células beta, o que preserva a estabilidade euglicêmica (Bolli e Gerich, 1984; Carroll e Schade, 2005). No diabetes, por outro lado, a deficiência na primeira fase de secreção e a resistência hepática ao despertar dificultam essa supressão, o que é compatível com a elevação glicêmica contínua observada nesta amostra.

Para além da exposição incremental acumulada, a elevada velocidade instantânea de ascensão ((dG/dt)max) evidencia uma dimensão cinética da trajetória glicêmica que escapa às avaliações estáticas tradicionais. A prática clínica prioriza marcadores de estado estático, como a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada (Danne et al., 2017; Rodacki et al., 2024). Já a extração computacional de derivadas contínuas revela um gradiente de influxo glicêmico que permanece invisível em monitoramentos transversais (Kovatchev et al., 2005; Qian et al., 2026). Como observam Klonoff et al. (2025), métricas estáticas tradicionais tendem a ocultar subfenótipos metabólicos que só se tornam visíveis quando a trajetória glicêmica inteira é tratada como uma função contínua, e não como um

conjunto de pontos discretos. Essa cinética acentuada no período matinal reitera, assim, a necessidade de ferramentas analíticas dinâmicas, fornecendo parâmetros para a caracterização do Fenômeno do Alvorecer nas horas seguintes ao despertar.

3.4. Decomposição Morfológica Contínua por Análise Funcional

A Análise de Componentes Principais Funcionais Esparsos (Sparse FPCA) permitiu caracterizar a morfologia contínua das trajetórias glicêmicas matinais, decompondo as curvas em dois modos fundamentais de variação: amplitude e sincronização temporal (Figura 10). O primeiro componente funcional (FPC_1), responsável por 92,8% da variância total, capturou a magnitude da excursão glicêmica e discriminou significativamente os grupos clínicos ($U = 462,0$; $p < 0,0001$; rrb = -0,974; Tabela 4). Os indivíduos do grupo Controle concentraram-se no espectro negativo ($FPC1 < 0$), caracterizado por rápido amortecimento e baixa amplitude da curva matinal. Em contraste, os pacientes com DM2 concentraram-se no espectro positivo ($FPC1 > 0$), exibindo ascensão acentuada e prolongada elevação da glicemia pós-despertar.

O segundo componente (FPC_2), responsável por 5,8% da variância, representou os desvios de fase e a velocidade temporal até o ápice da curva. Este componente não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($U = 231,0$; $p = 0,847$; rrb = -0,038). Fisiologicamente, a equivalência em FPC2 indica que o fenômeno metabólico matinal ocorre na mesma janela cronológica relativa ao despertar em ambos os grupos, demonstrando que o diabetes mellitus tipo 2 altera a magnitude e a sustentação da elevação glicêmica, mas preserva a fase temporal do disparo contrarregulador matinal.

A distinção morfológica capturada pelo FPC_1 é compatível com os mecanismos de contrarregulação neuroendócrina matinal. Em indivíduos normoglicêmicos, a liberação circadiana de hormônios contrarreguladores estimula a produção hepática de glicose, a qual é fisiologicamente compensada pela elevação imediata da secreção insulínica (Schmidt et al., 1981; Bolli e Gerich, 1984; Peng et al., 2022). O padrão de maior amplitude e excursão sustentada ($FPC_1 > 0$) observado no DM2 alinha-se ao déficit na primeira fase de secreção de insulina e à supressão ineficiente da secreção de glucagon. Segundo a literatura, esses fatores contribuiriam para a elevação sustentada da glicemia pós-despertar (Schmidt et al., 1981; Porcellati et al., 2013).

A literatura aponta que a avaliação clínica global pode ocultar heterogeneidades morfológicas pós-despertar, com trajetórias individuais que variam desde uma ascensão rápida até aumentos lentos e prolongados (Hall et al., 2018; Gecili et al., 2021; Klonoff et al., 2025). Nesse sentido, a extração computacional de descritores longitudinais por Sparse FPCA corrobora a utilidade da análise contínua do Fenômeno do Alvorecer, revelando nuances da arquitetura cinética matinal indetectáveis por pontos de corte estáticos.

3.5. Modelagem Multivariada e Ritmicidade Circadiana

3.5.1.Estabilidade circadiana paradoxal no DM2 e a hipótese do sedentarismo

A quantificação dos índices não paramétricos do ritmo de atividade-repouso evidenciou maior Estabilidade Interdiária (IS) no grupo DM2 em comparação ao Controle, com mediana de 0,46 (Q1–Q3: 0,41–0,56) versus 0,39 (Q1–Q3: 0,35–0,42) ($U = 381,0$; $p =$

0,0020; rrb = −0,584; Figura 11 e Tabela 4). Já a Variabilidade Intradiária horária (IV) foi numericamente menor no grupo DM2, com mediana de 0,83 (Q1–Q3: 0,70–0,97) versus 0,94 (Q1–Q3: 0,86–1,02) no grupo Controle, porém não atingiu significância estatística ao nível de 0,05 (U = 165,0; p = 0,0972; rrb = +0,314).

O perfil observado diverge do padrão clássico da cronobiologia do envelhecimento, no qual o avanço da idade se associa à hiperfragmentação rítmica (Witting et al., 1990). Aqui, porém, a coorte de DM2 mostrou o comportamento inverso, com maior IS e menor IV, o que pode se alinhar a rotinas domésticas restritas, que limitam a variabilidade motora voluntária (Mitchell et al., 2017). Essa dinâmica é corroborada pelos resultados do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): o grupo DM2 apresentou prevalência superior de comportamento sedentário ou de baixa atividade física (65,7%, n = 23) em relação ao Controle (15,4%, n = 2; p = 0,0029; Tabela 5). O menor IV na coorte diabética é, assim, compatível com limitações no repertório motor associadas a esse comportamento sedentário com inatividades contínuas no padrão de atividade-repouso.

A menor estabilidade (IS) no grupo Controle é compatível com o fenômeno do jetlag social acadêmico (Roenneberg et al., 2012). O método de Wittmann et al. (2006) aplicado indicou um atraso de fase com mediana de 2,00 horas na janela de menor atividade motora (L_5) entre dias úteis e dias livres (teste de postos sinalizados de Wilcoxon, p = 0,0005; Figura 12). Esse desalinhamento objetivo concorda com a caracterização psicométrica subjetiva (Figura 13; Tabela 5): 69,2% dos controles apresentaram cronotipo vespertino moderado, com jetlag social subjetivo de 1,83 horas (1h 50min) medido pelo MCTQ. O grupo também registrou níveis adequados de atividade física no IPAQ (84,6%) e baixo risco basal em parâmetros de apneia do sono e afetividade.

3.5.2. Associação inversa entre IV e $iAUC_{3h}$ no modelo conjunto ajustado

As matrizes de correlação de Spearman integraram as dimensões metabólicas e comportamentais (Figura 14). Em ambos os grupos, a $iAUC_{3h}$ correlacionou-se positivamente à (dG/dt)max (DM2: ρ = +0,87, p < 0,001; Controle: ρ = +0,88, p < 0,001). No grupo DM2, a Variabilidade Intradiária (IV) associou-se negativamente à $iAUC_{3h}$ (ρ = −0,39, p = 0,0163) e à (dG/dt)max (ρ = −0,35, p = 0,0363), um indício de que blocos prolongados e ininterruptos de inatividade postural e rotinas motoras monótonas acompanham o aumento da excursão glicêmica (Paing et al., 2020). A Estabilidade Interdiária (IS) e a dispersão do horário de despertar (ΔT_0) também se correlacionaram negativamente (ρ = −0,30), indicando tendência de que maior regularidade circadiana interdiária acompanha menor variabilidade no horário de despertar, embora sem atingir significância estatística formal (p = 0,0781). Já no grupo Controle, observou-se correlação negativa entre Idade e $iAUC_{3h}$ (ρ = −0,59, p = 0,0348), padrão alinhado à maior exposição ao jetlag social em faixas etárias jovens (Roenneberg et al., 2012).

A modelagem multivariada com estimador robusto HC3 (MacKinnon e White; Tabela 6) avaliou a associação da ritmicidade com a cinética glicêmica matinal, incluindo ajuste por idade centrada e sexo biológico em todos os painéis. Inicialmente, nos modelos parciais com especificação de termos multiplicativos, o DM2 manteve associação independente tanto no modelo com IS (Painel A: β = +6.219,4 mg/dL·min; p < 0,001) quanto com IV (Painel B: β = +5.538,7 mg/dL·min; p = 0,0035). A avaliação de modificação de efeito confirmou a ausência de interações estatisticamente significativas

entre o diagnóstico clínico e os biomarcadores circadianos (Grupo × IS: p = 0,578; Grupo × IV: p = 0,155; Figura 15).

A homogeneidade das inclinações autorizou a especificação do modelo conjunto aditivo multivariado (Tabela 6, Painel C). Sob controle simultâneo por IS, IV, idade e sexo, o diagnóstico de DM2 manteve associação independente e expressiva com a exposição glicêmica incremental (β = +5.477,3 mg/dL·min; p = 0,0061). Paralelamente, a fragmentação horária do ritmo (IV centrada) sustentou uma associação inversa estatisticamente significativa com a área matinal (β = −6.716,4 mg/dL·min; p = 0,0324). A estabilidade matemática e a ausência de colinearidade deletéria no modelo definitivo foram atestadas pelos Fatores de Inflação de Variância, todos abaixo de 2,5 (VIF < 2,5).

3.5.3. Fragmentação circadiana e glicemia matinal: uma associação inversa

A identificação de um coeficiente negativo expressivo para a Variabilidade Intradiária (β = −6.716,4 mg/dL·min; p = 0,0324) no modelo conjunto multivariado revela uma dinâmica comportamental e metabólica de grande relevância clínica. Embora a literatura clássica associe níveis elevados de IV à disrupção do ritmo circadiano no envelhecimento patológico e em distúrbios neurodegenerativos (Witting et al., 1990; Mitchell et al., 2017), o contexto metabólico do DM2 traz uma nuance funcional distinta: um índice de IV reduzido reflete uma rotina motora excessivamente monótona, marcada por longos períodos contínuos de imobilidade.

Nesse cenário, valores mais elevados de IV expressam maior alternância intradiária entre repouso e movimento, indicando a dispersão de breves episódios de atividade física ao longo da vigília com frequentes interrupções dos ciclos sedentários. Evidências clínicas demonstram que a quebra ativa de blocos prolongados de inatividade postural melhora a sensibilidade periférica à insulina, otimiza a translocação de transportadores GLUT4 e atenua o escape glicêmico basal e pós-despertar (Dunstan et al., 2012; Paing et al., 2020). Alinhado a essa literatura, o presente achado sugere que um padrão de atividade mais fracionado ao longo do dia associa-se a menor exposição glicêmica matinal no DM2. Cabe ressalvar, contudo, que o desenho seccional empregado nesta análise não permite estabelecer a direção causal dessa relação.

3.6. Limitações e Perspectivas Futuras

O delineamento observacional em vida livre introduz fontes inerentes de variação ecológica (Barua et al., 2024). No entanto, o algoritmo WAKE-UP buscou mitigar parte dessas variações por meio de uma normalização intrassujeito baseada em percentis diários, contornando flutuações vasomotoras periféricas decorrentes de climatização artificial ou a presença de neuropatia periférica no grupo com DM2 (Cavalcanti-Ferreira et al., 2018). Embora a ausência de validação simultânea por polissonografia configure-se como uma limitação intrínseca ao registro de sono por actimetria isolada (Ancoli-Israel et al., 2003; van Hees et al., 2018), esse ponto constitui uma direção para estudos futuros.

Por fim, o impacto da indisponibilidade de diários alimentares padronizados na rotina de vida livre foi atenuado por uma estratégia de recorte matemático das curvas glicêmicas, ainda assim, essa limitação específica motivou o desenvolvimento, em nosso laboratório, do aplicativo ARIAN, que propõe o registro nutricional em tempo real sincronizando os eventos como alternativa aos diários alimentares através de técnicas computacionais.

Espera-se que essa ferramenta permita, em estudos futuros, isolar com maior precisão a contribuição da alimentação na dinâmica glicêmica dos participantes através dos algoritmos melhor aprimorados.

Conclusão

A dinâmica da excursão glicêmica matinal no Fenômeno do Alvorecer associou-se significativamente à fragmentação do ritmo de atividade-repouso, evidenciando padrões cinéticos e morfológicos divergentes entre indivíduos com diabetes tipo 2 (DM2) e controles normoglicêmicos em vida livre. No plano metodológico, a fusão de sinais motores e térmicos pelo algoritmo WAKE-UP demonstrou alta acurácia temporal para a identificação do despertar biológico, superando a abordagem unissensorial e a convenção de horários fixos, além de equivaler-se estatisticamente ao método bimodal de referência (fusão termo-motora com suavização por Savitzky-Golay). Essa ancoragem reduz a dependência de instrumentos subjetivos, como os diários de sono (aqui utilizados como padrão ecológico de comparação, embora vulneráveis a falhas de memória), viabilizando o isolamento fidedigno da resposta metabólica endógena.

Do ponto de vista clínico-fisiológico, o DM2 alterou substancialmente a magnitude e a velocidade da elevação glicêmica matinal, sem modificar sua sincronização temporal intrínseca. Sob ancoragem algorítmica, os pacientes apresentaram maior exposição incremental e aceleração instantânea pós-despertar, com efeitos independentes de idade e sexo nos modelos ajustados; a análise funcional revelou amplificação da amplitude e da persistência da curva, mantendo preservado o tempo até o pico observado na euglicemia. Quanto à ritmicidade, apenas a Variabilidade Intradiária revelou associação inversa com a exposição glicêmica no modelo multivariado final, ao passo que a Estabilidade Interdiária não sustentou significância própria. Esse resultado indica que a fragmentação motora intradiária, e não a regularidade entre os dias, associa-se a menor escape glicêmico. Cabe ressalvar, contudo, que o desenho seccional empregado nesta análise não permite estabelecer a direção causal dessa relação.

Limitações estruturais devem ser consideradas: a ausência de sobreposição etária entre as coortes é atenuada, mas não eliminada, pelo ajuste estatístico; o grupo Controle apresentou perfil circadiano próprio, com cronotipo vespertino predominante e jetlag social elevado, exigindo cautela ao interpretá-lo como referencial cronobiológico neutro; e a ausência de polissonografia concorrente e de controle estrito da primeira refeição matinal limita a caracterização fina do sono e a dissociação completa entre despertar e interferência alimentar precoce.

Para pesquisas futuras, recomenda-se validação concorrente por polissonografia, recrutamento de coortes com maior sobreposição etária e integração do WAKE-UP a ferramentas de registro nutricional em tempo real, direção em desenvolvimento por meio do aplicativo ARIAN. Essa integração consolida uma linha de cronomedicina translacional voltada à identificação individualizada de janelas de risco metabólico no manejo do Fenômeno do Alvorecer no DM2.

Referências

ANCOLI-ISRAEL, S. et al. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. Sleep, v. 26, n. 3, p. 342-392, 2003.

BARUA, S. et al. The northeast glucose drift: stratification of postbreakfast dysglycemia among predominantly Hispanic/Latino adults at-risk or with type 2 diabetes. eClinicalMedicine, v. 43, p. 101241, 2022.

BARUA, S. et al. A probabilistic computation framework to estimate the dawn phenomenon in type 2 diabetes using continuous glucose monitoring. Scientific Reports, v. 14, p. 2597, 2024.

BAYSAL, N. et al. A novel method to detect pressure-induced sensor attenuations (PISA) in an artificial pancreas. Journal of Diabetes Science and Technology, v. 8, n. 6, p. 1091-1096, 2014.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. The Lancet, v. 327, n. 8476, p. 307-310, 1986.

BOLLI, G. B.; GERICH, J. E. The dawn phenomenon: a common occurrence in both non-insulin-dependent and insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine, v. 310, n. 12, p. 746-750, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2023: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023.

CARROLL, M. F.; SCHADE, D. S. The dawn phenomenon revisited: implications for diabetes therapy. Endocrine Practice, v. 11, n. 1, p. 55-64, 2005.

CAVALCANTI-FERREIRA, P. et al. A nonparametric methodological analysis of rest-activity rhythm in type 2 diabetes. Sleep Science, v. 11, n. 4, p. 282-288, 2018.

CHEN, S.; SUN, X. Validating CircaCP: a generic sleep-wake cycle detection algorithm for unlabelled actigraphy data. Royal Society Open Science, v. 11, p. 231468, 2024.

CICHOSZ, S. L. et al. From data to insights: a tool for comprehensive quantification of continuous glucose monitoring (QoCGM). PeerJ, v. 13, e19501, 2025.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. Endocrine Reviews, v. 39, n. 6, p. 990-1028, 2018.

DANNE, T. et al. International consensus on use of continuous glucose monitoring. Diabetes Care, v. 40, n. 12, p. 1631-1640, 2017.

DEMŠAR, J. Statistical comparisons of classifiers over multiple data sets. Journal of Machine Learning Research, v. 7, p. 1-30, 2006.

DUNSTAN, D. W. et al. Breaking up prolonged sitting reduces postprandial glucose and insulin responses. Diabetes Care, v. 35, n. 5, p. 976-983, 2012.

FONDA, S. J.; LEWIS, D. G.; VIGERSKY, R. A. Minding the gaps in continuous glucose monitoring. Journal of Diabetes Science and Technology, v. 7, n. 1, p. 88-92, 2013.

GECILI, E. et al. Functional data analysis and prediction tools for continuous glucose-monitoring studies. Journal of Clinical and Translational Science, v. 5, n. 1, e51, 2021.

HALL, H. et al. Glucotypes reveal new patterns of glucose dysregulation. PLoS Biology, v. 16, n. 7, e2005143, 2018.

HAMMAD, G. et al. pyActigraphy: open-source Python package for actigraphy data visualization and analysis. PLoS Computational Biology, v. 17, n. 10, e1009514, 2021.

KLONOFF, D. C. et al. Continuous glucose monitoring data analysis 2.0: functional data pattern recognition and artificial intelligence applications. Journal of Diabetes Science and Technology, v. 19, n. 6, p. 1515-1527, 2025.

KOVATCHEV, B. P. et al. Quantifying temporal glucose variability in diabetes via continuous glucose monitoring. Diabetes Technology & Therapeutics, v. 7, n. 6, p. 849-862, 2005.

MACKINNON, J. G.; WHITE, H. Some heteroskedasticity-consistent covariance matrix estimators with improved finite sample properties. Journal of Econometrics, v. 29, n. 3, p. 305-325, 1985.

MASON, I. C. et al. Impact of circadian disruption on glucose metabolism. Diabetologia, v. 63, n. 3, p. 462-472, 2020.

MITCHELL, J. A. et al. Variation in actigraphy-estimated rest-activity patterns by demographic factors. Chronobiology International, v. 34, n. 8, p. 1042-1056, 2017.

MONNIER, L. et al. Magnitude of the dawn phenomenon and its impact on the overall glucose exposure in type 2 diabetes: is this of concern? Diabetes Care, v. 36, n. 12, p. 4057-4062, 2013.

MORRIS, C. J. et al. Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, n. 30, p. E2225-E2234, 2015.

ORTIZ-TUDELA, E. et al. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. PLoS Computational Biology, v. 6, n. 11, e1000996, 2010.

PAING, A. C. et al. Diurnal patterns of objectively measured sedentary time and interruptions to sedentary time are associated with glycaemic indices in type 2 diabetes. Journal of Science and Medicine in Sport, v. 23, n. 11, p. 1074-1079, 2020.

PENG, F. et al. Circadian clock, diurnal glucose metabolic rhythm, and dawn phenomenon. Trends in Neurosciences, v. 45, n. 6, p. 471-482, 2022.

POGGIOGALLE, E.; JAMSHED, H.; PETERSON, C. M. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. Metabolism, v. 84, p. 11-27, 2018.

PORCELLATI, F. et al. Thirty years of research on the dawn phenomenon: lessons to optimize blood glucose control in diabetes. Diabetes Care, v. 36, n. 12, p. 3860-3862, 2013.

PUGLIANE, K. C. et al. Low-latitude environmental regularity supports circadian organisation in blind adults. Chronobiology International, v. 43, n. 4, p. 1-15, 2026.

QIAN, J.; SCHEER, F. A. J. L. Circadian system and glucose metabolism: implications for physiology and disease. Trends in Endocrinology & Metabolism, v. 27, n. 5, p. 282-293, 2016.

QIAN, T. et al. Beyond HbA1c: a CGM-centred three-pillar framework for glycaemic variability in pre-diabetes and type 2 diabetes. Diabetic Medicine, v. 43, n. 1, e70404, 2026.

REFINETTI, R. et al. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. Biological Rhythm Research, v. 38, n. 4, p. 275-325, 2007.

REHMAN, N. U. et al. The impact of missing continuous blood glucose samples on machine learning models for predicting postprandial hypoglycemia: an experimental analysis. Mathematics, v. 12, n. 10, 1567, 2024.

RODACKI, M. et al. Diagnóstico de Diabetes Mellitus. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: SBD, 2024.

ROENNEBERG, T. et al. Social jetlag and obesity. Current Biology, v. 22, n. 10, p. 939-943, 2012.

SCHMIDT, M. I. et al. The dawn phenomenon, an early morning glucose rise: implications for diabetic intraday blood glucose variation. Diabetes Care, v. 4, n. 6, p. 579-585, 1981.

VAN HEES, V. et al. Estimating sleep parameters using an accelerometer without sleep diary. Scientific Reports, v. 8, p. 12975, 2018.

VAN SOMEREN, E. J. W. et al. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. Chronobiology International, v. 14, n. 3, p. 291-302, 1997.

WITTING, W. et al. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. Biological Psychiatry, v. 27, n. 6, p. 563-572, 1990.

WITTMANN, M. et al. Social jetlag: misalignment of biological and social time. Chronobiology International, v. 23, n. 1-2, p. 497-509, 2006.

Anexos



Figura 1

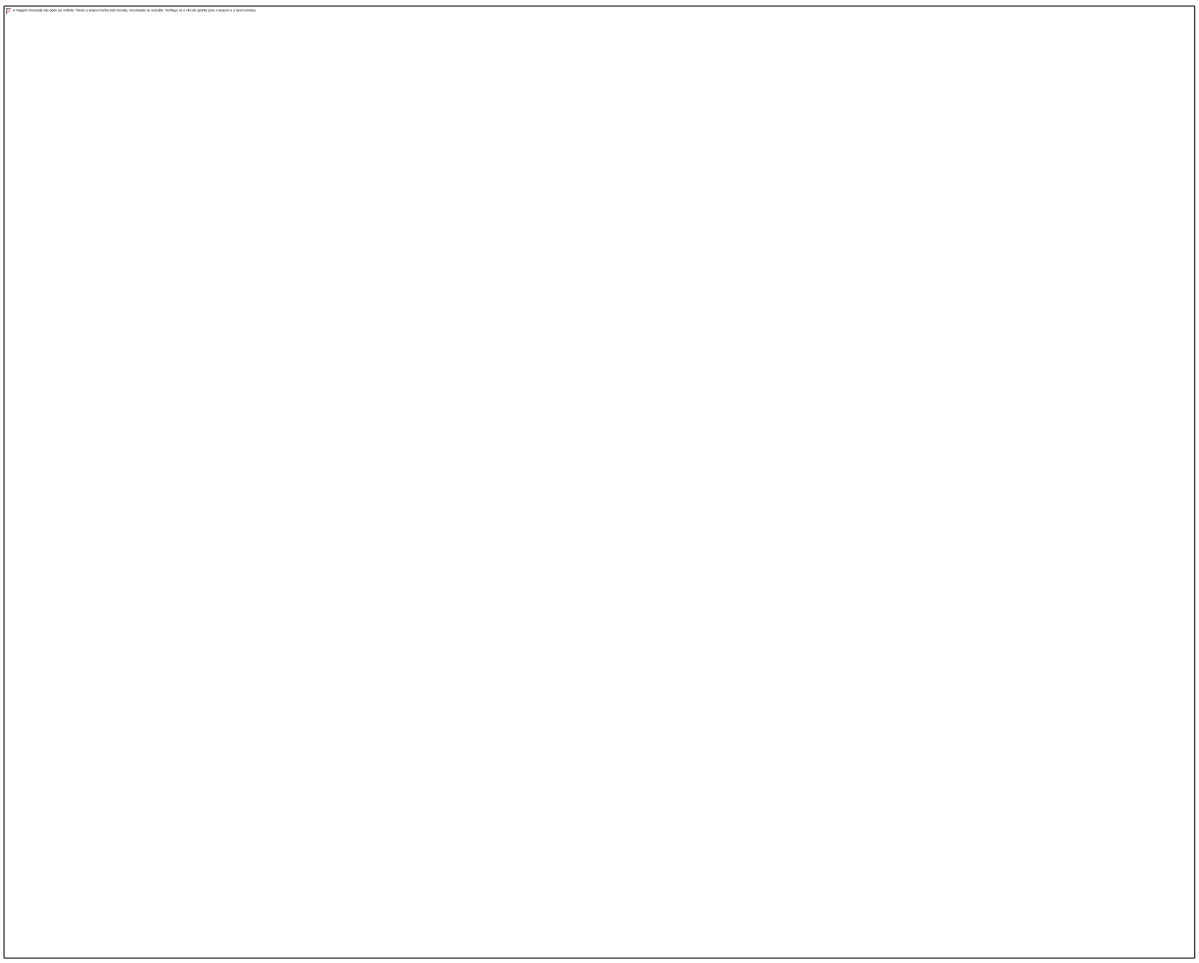


Figura 2



Figura 3

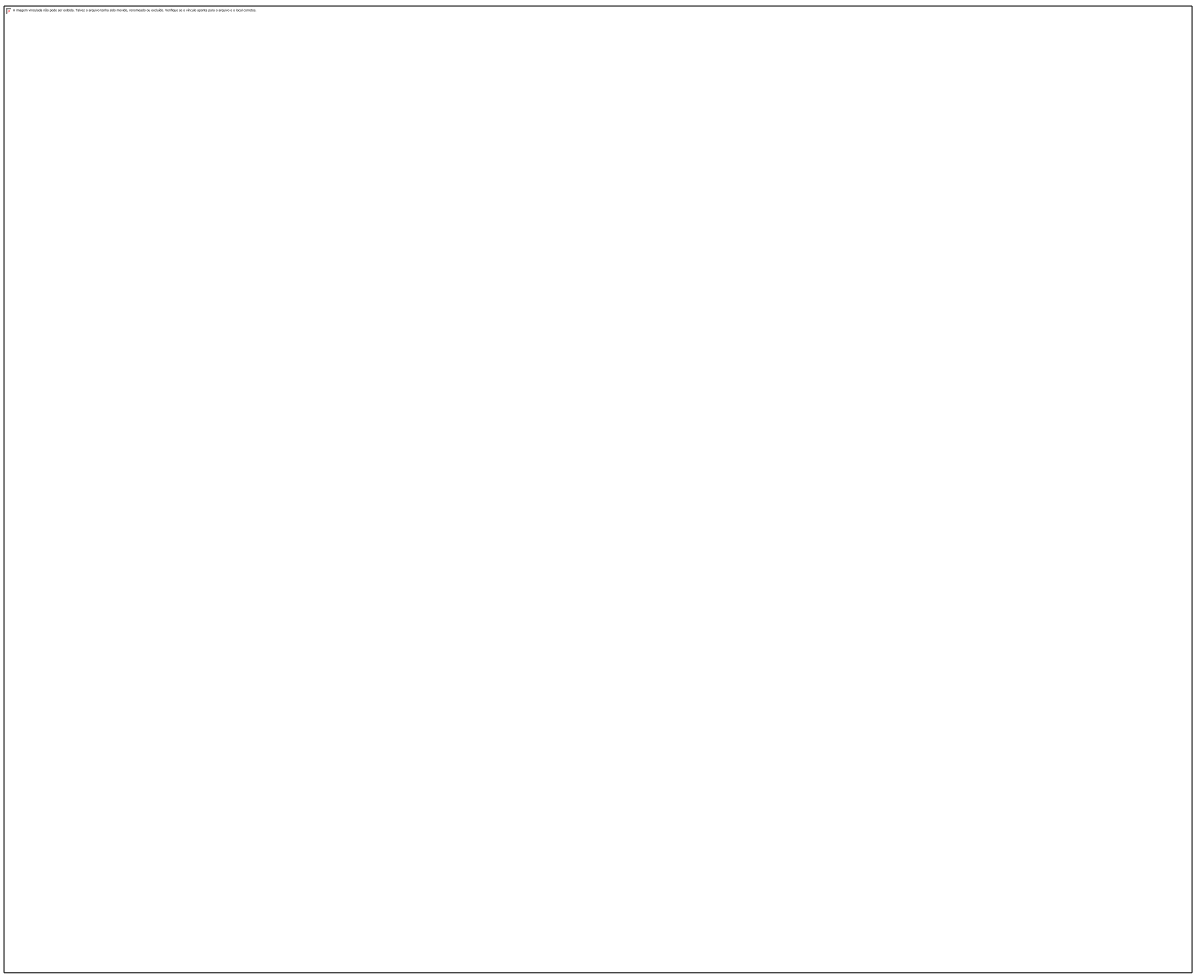


Figura 4



Figura 5

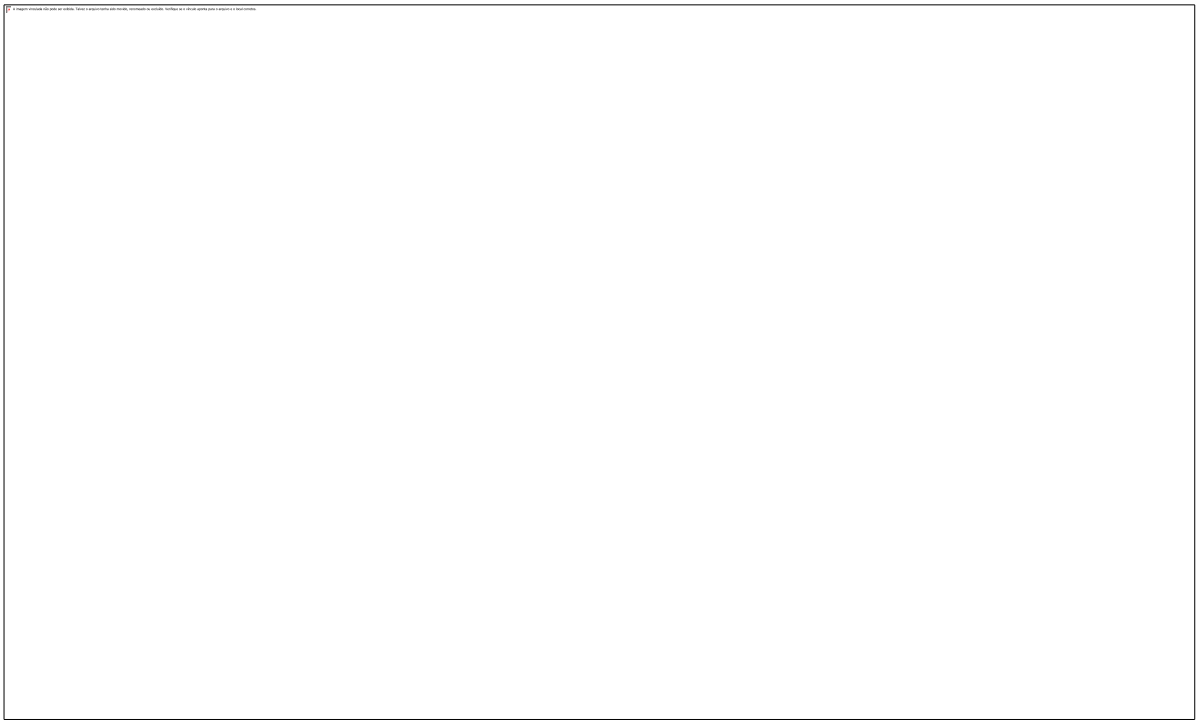


Figura 6



Figura 7

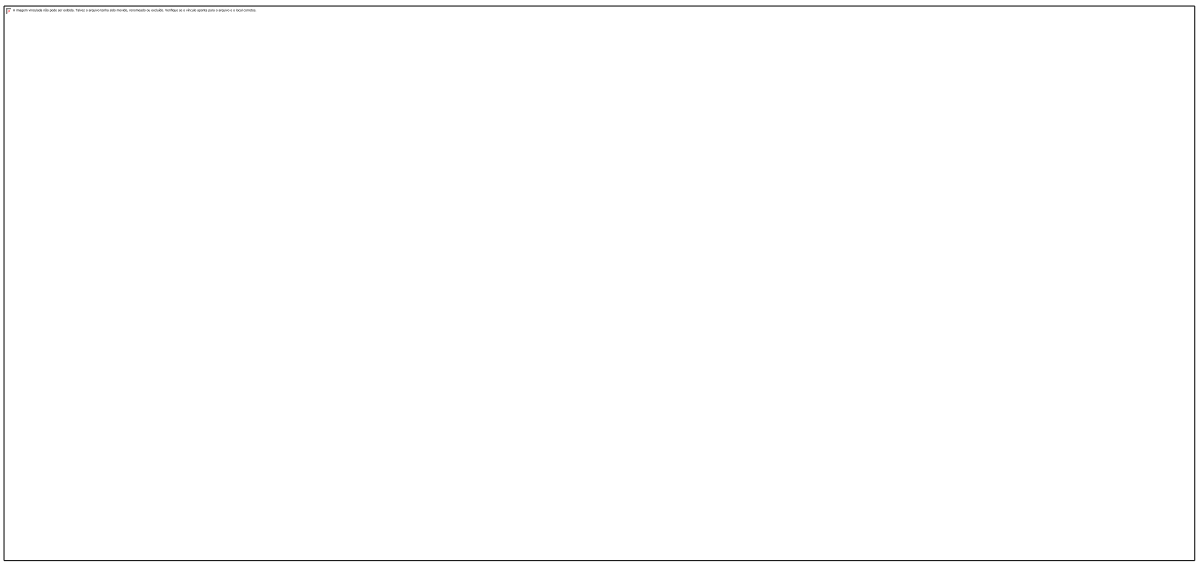


Figura 8

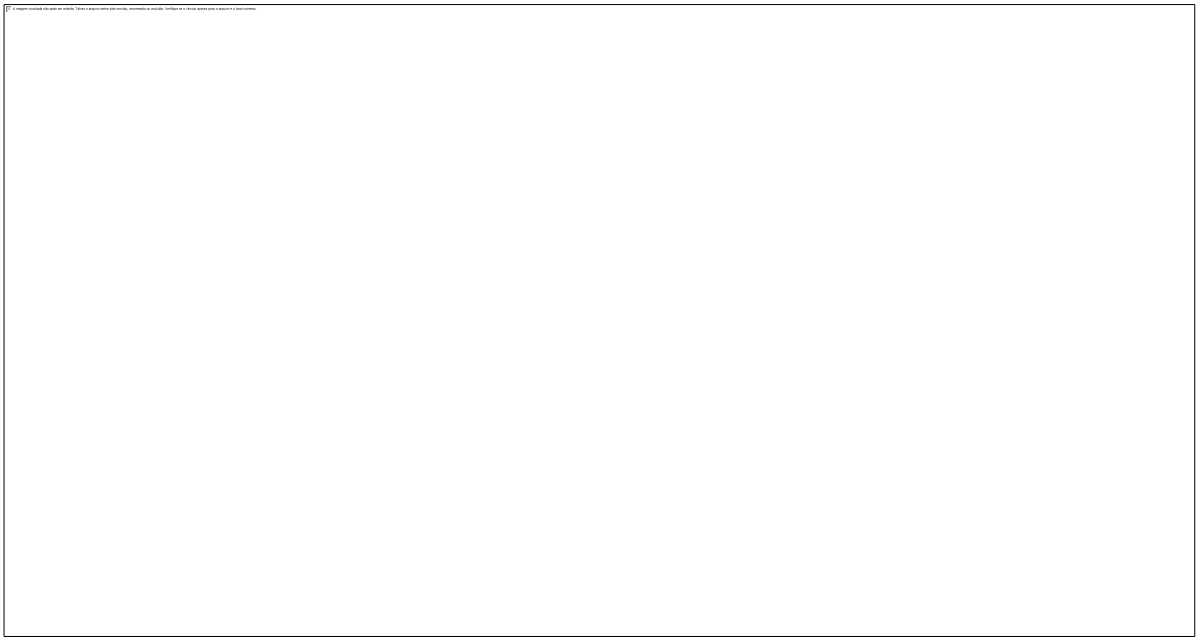


Figura 9

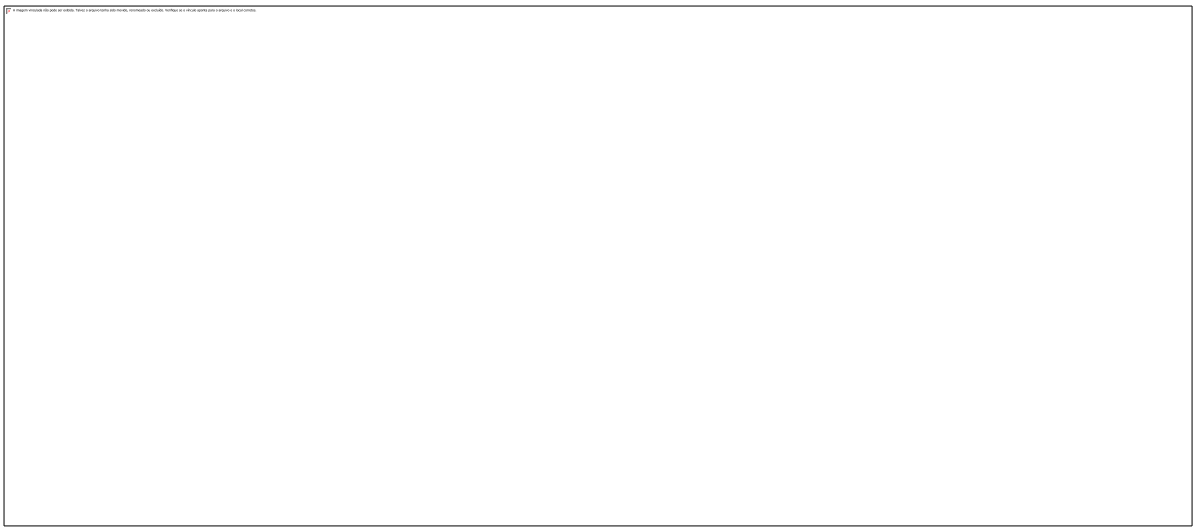


Figura 10

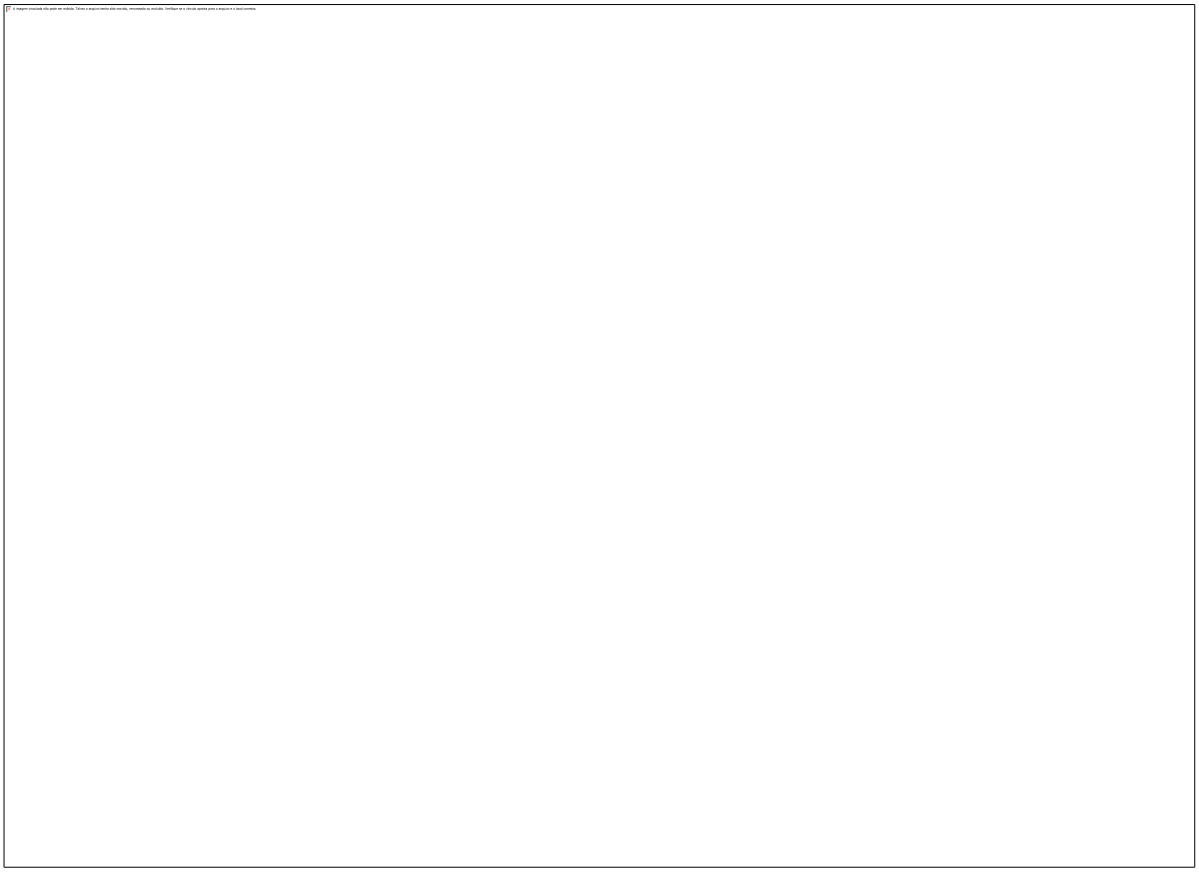


Figura 11



Figura 12

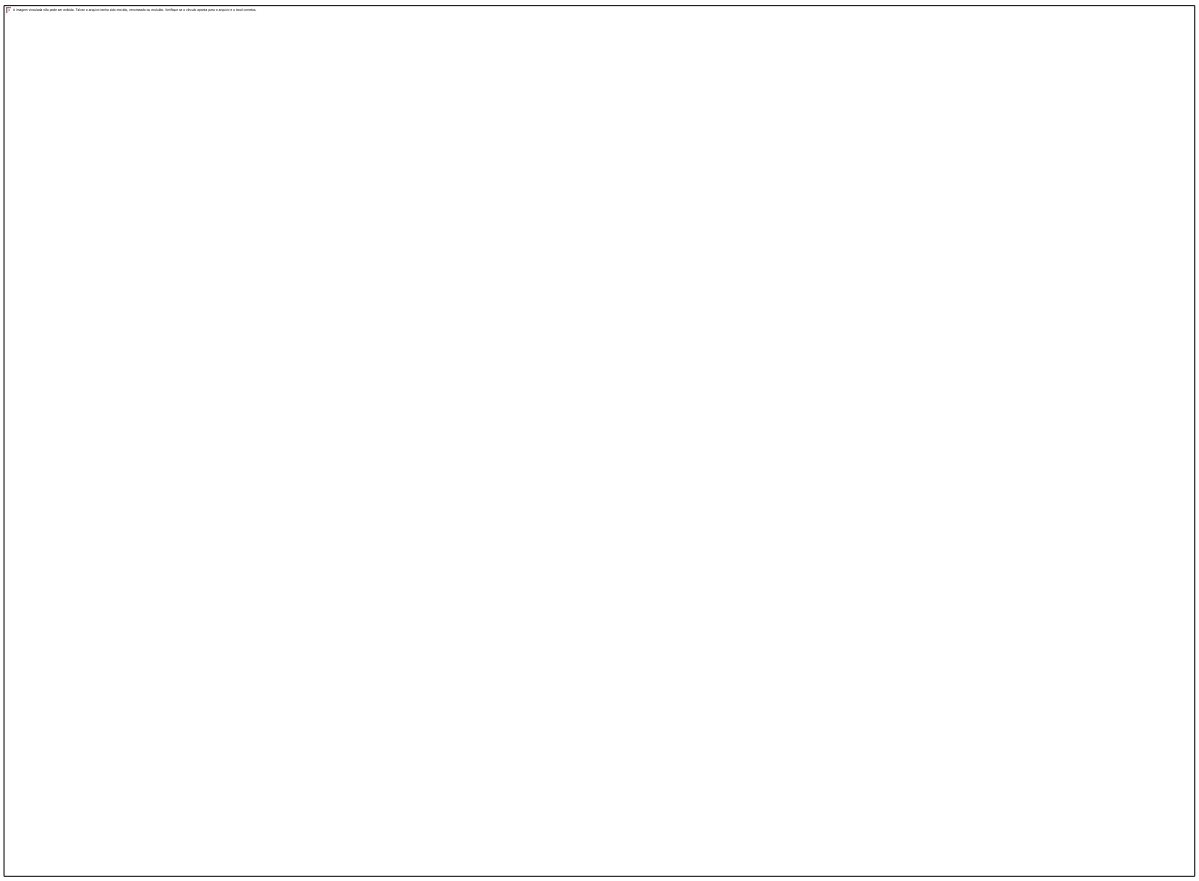


Figura 13

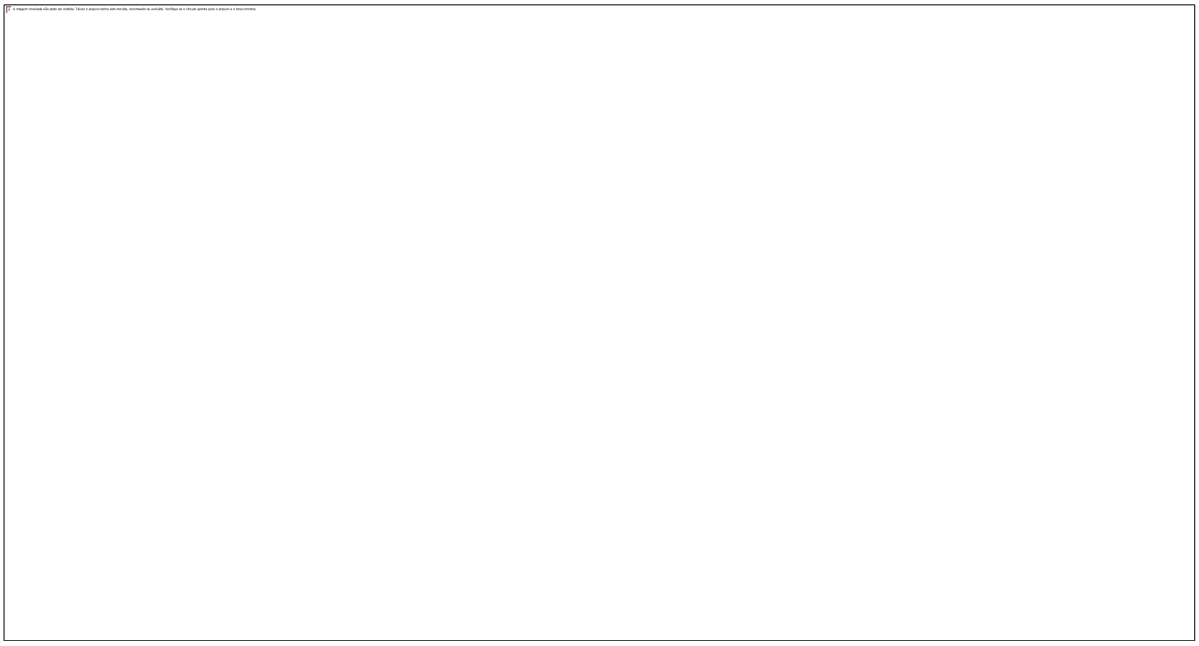


Figura 14

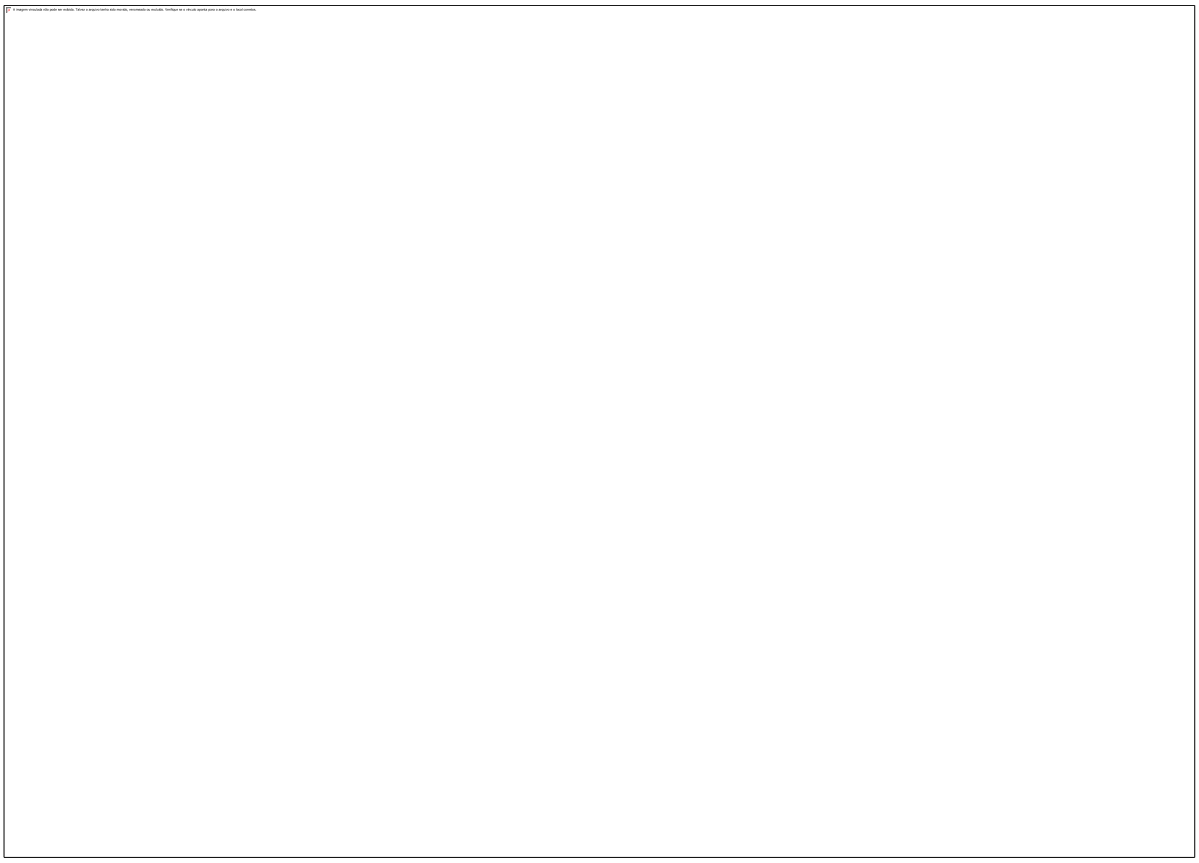


Figura 15

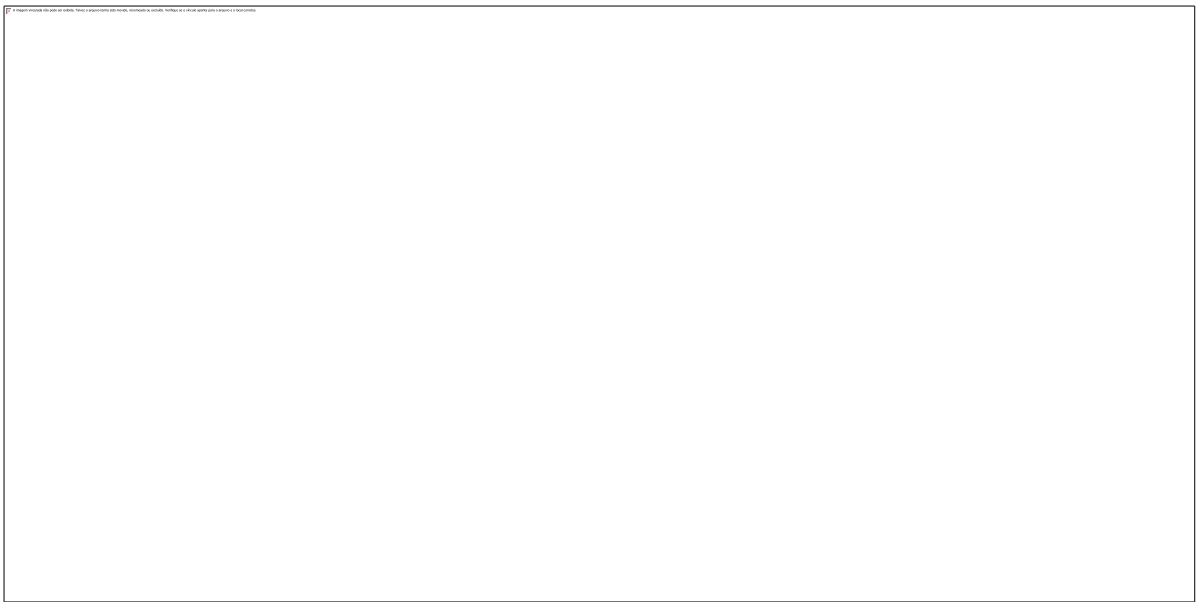


Tabela 1: Caracterização demográfica e clínica basal dos grupos DM2 e Controle

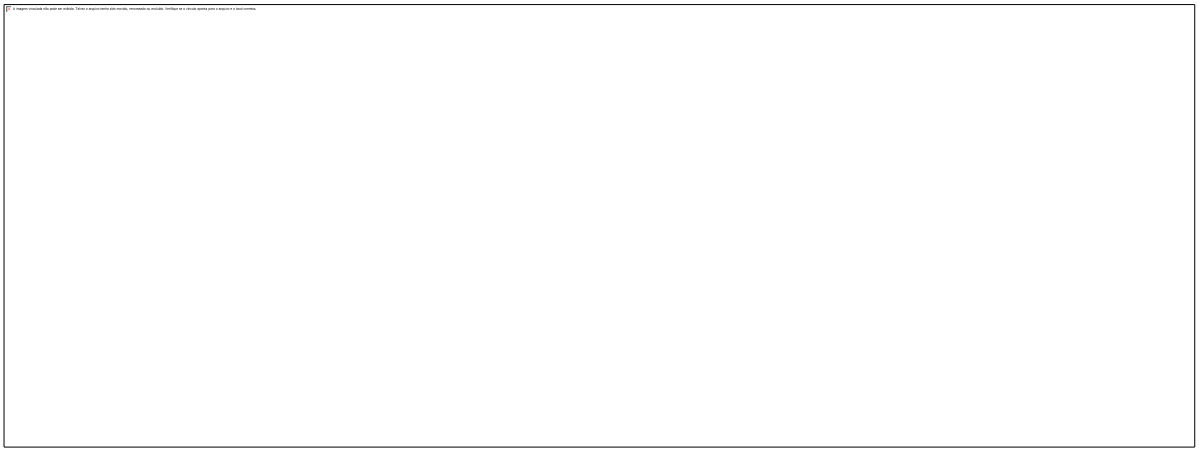


Tabela 2: Seleção da estrutura de covariância para o modelo GEE longitudinal



Tabela 3: Modelagem multivariada da cinética glicêmica matinal (Ajuste por Idade e Sexo)



Tabela 4: Painel abrangente de métricas glicêmicas, cinéticas, funcionais e circadianas

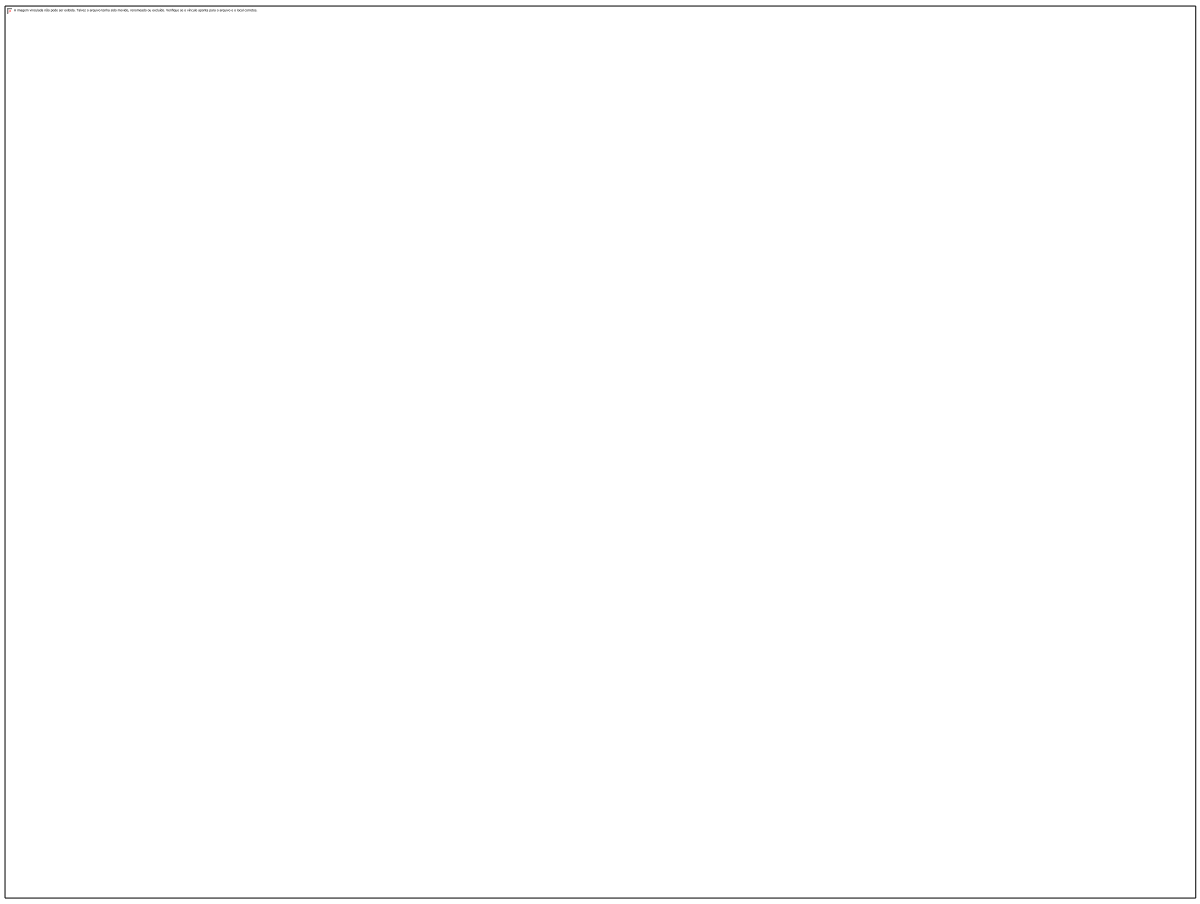


Tabela 5: Perfil psicométrico, cronobiológico e comportamental dos questionários (DM2 vs. Controle)



Tabela 6: Modelagem multivariada robusta (HC3) e análise de interação circadiana sobre a iAUC 3h



Tabela Suplementar S1: Desempenho metrológico e acurácia dos modelos de detecção do despertar biológico (T0) frente ao padrão-ouro ecológico dos diários de sono (n = 101 ciclos matinais pareados)

CÓDIGO: OU1676

AUTOR: CECILIA VITORIA LOPES PEIXOTO

COAUTOR: LETÍCIA GURGEL BEZERRA MEDEIROS CAVALCANTI

COAUTOR: ANDRÉ FELIPE DE VASCONCELOS DUARTE

ORIENTADOR: ELIZA MARIA XAVIER FREIRE

TÍTULO: A Fauna de Répteis Squamata em remanescentes florestais do Campus central da UFRN: Consolidação do conhecimento e do Monitoramento

Resumo

A fragmentação florestal é um dos principais fatores responsáveis por eventos de extinção, e a urbanização intensifica esse cenário, especialmente nos remanescentes da Mata Atlântica nordestina. Esse fenômeno promove o isolamento das populações, a redução da diversidade genética e o aumento da vulnerabilidade das espécies às ameaças ambientais. Até a década de 1970, a atual área do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) era composta por cobertura vegetal contínua com o Parque Estadual das Dunas de Natal. Após a construção do Campus, restaram fragmentos de mata isolados. Nesse contexto, este estudo realiza o monitoramento de répteis da ordem Squamata nesses remanescentes, iniciado em 2009, com novos levantamentos em 2019 e 2025. Foram monitorados a Mata dos Saguis, o entorno da Reitoria e a Mata da CAERN. Em cada área, foram estabelecidos três quadrantes de 250 m², com buscas ativas cinco vezes por mês. As armadilhas de interceptação e queda permaneceram abertas por cinco dias consecutivos em cada campanha, sendo inspecionadas diariamente, entre 8h e 17h.

Palavras-chave: Lagartos. Fragmentação. Mata Atlântica. Serpentes.

TITLE: The Squamate Reptile Fauna in Forest Remnants of the UFRN Central Campus: Consolidation of Knowledge and Monitoring

Abstract

Forest fragmentation and urbanization threaten biodiversity by isolating populations and increasing species vulnerability. Until the 1970s, the area currently occupied by the

Central Campus of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) was connected to the Natal Dunes State Park, but the construction of the Campus resulted in isolated forest remnants. This study monitored squamate reptiles in three remnants: Mata dos Saguis, the area surrounding the Rectory, and the CAERN Forest. Monitoring began in 2009, with subsequent surveys in 2019 and 2025. Sampling included active searches and pitfall traps with drift fences. In 2025–2026, 305 individuals belonging to 16 species were recorded. Tropidurus hispidus and the invasive exotic species Hemidactylus mabouia were prominent. Coleodactylus natalensis, a lizard endemic to Rio Grande do Norte with a restricted distribution and threatened with extinction, was also recorded. The results highlight the importance of conserving urban forest remnants for biodiversity, particularly endemic and threatened species.

Keywords: Lizards. Fragmentation. Atlantic Forest. Snakes.

Introdução

A Mata Atlântica brasileira é um dos principais hotspots de biodiversidade do mundo, devido à sua grande riqueza de espécies, ao maior número de endemismos e extenso nível de ameaças (MYERS et al., 2000). No Nordeste brasileiro, a herpetofauna apresenta elevada diversidade e desempenha importantes funções ecológicas, incluindo a participação nas cadeias alimentares e o controle natural de populações de insetos (OLIVEIRA; LUCENA; FREIRE, 2017). Apesar de sua importância, a Mata Atlântica nordestina é a mais fragmentada, com intensa ocupação humana e mudanças no uso do solo, que alteram diretamente os ambientes naturais (TABARELLI et al., 2005). Portanto, é fundamental o desenvolvimento de estudos e projetos, especialmente no Centro de Endemismo Pernambuco que se distribui entre os estados de Alagoas e Rio Grande do Norte, o qual ainda abriga riqueza e endemismo de espécies (FREIRE et al., 2018a, 2018b DUBEUX et al., 2025).

A fragmentação de habitat é considerada uma das principais ameaças à biodiversidade (FAHRIG, 2003); este diferencia a perda de habitat da fragmentação, sendo a primeira relacionada à redução da quantidade de habitat disponível e a segunda à divisão do habitat restante em áreas menores e mais isoladas. Esse processo pode aumentar os efeitos de borda e alterar características do ambiente, como as condições de temperatura e umidade, podendo influenciar a ocorrência e a distribuição das espécies (ALMEIDA-CORRÊA et al., 2020).

Os lagartos, pertencentes à ordem Squamata, podem responder às alterações nas condições do ambiente e, por isso, algumas espécies podem ser utilizadas como indicadoras de mudanças ambientais (RIBEIRO; FREIRE, 2011). Em áreas urbanizadas, espécies mais generalistas podem apresentar maior facilidade para ocupar ambientes alterados, enquanto espécies mais dependentes de determinadas condições ambientais podem ser prejudicadas pela redução e pelo isolamento dos fragmentos (FREIRE et al., 2019).

Nesse contexto, até a década de 1970, a atual área do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) era composta por cobertura vegetal contínua ao Parque Estadual das Dunas de Natal; após a construção do Campus nessa década, restaram fragmentos de mata isolados. Estes remanescentes de Mata Atlântica estão

inseridos em uma área bastante urbanizada do Campus e, dentre estes, elencamos as Matas dos Saguis, da Reitoria e a da CAERN para desenvolver este estudo. Mesmo sendo áreas relativamente pequenas, esses locais podem funcionar como abrigo para diferentes espécies de répteis e são importantes para o desenvolvimento de estudos sobre a fauna habitante do campus (SALES et al., 2009).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivos registrar e caracterizar a composição de espécies de répteis Squamata em remanescentes de Mata Atlântica do Campus Central da UFRN, avaliar a ocorrência das espécies em relação à fragmentação do habitat e à urbanização, e comparar a composição de espécies com a de outras áreas semelhantes próximas. Este trabalho contribui para o conhecimento da fauna de répteis presente nesses remanescentes, e o conjunto dos dados obtidos poderá subsidiar estratégias para a conservação das espécies e dessas áreas.

Metodologia

Área de estudo

O estudo foi conduzido em três remanescentes florestais localizados no Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN): Mata da CAERN, Bosque da Reitoria e Mata dos Saguis (Fig. 1).

A Mata da CAERN pertence à Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte (CAERN). A área é atravessada por uma rede coletora de esgoto, implantada na década de 1980, com aproximadamente sete quilômetros de extensão.

O Bosque da Reitoria apresenta intensa influência antrópica, refletida em alterações na estrutura e composição da vegetação. Atualmente, a área possui cobertura vegetal pouco densa, composta predominantemente por espécies arbóreas exóticas, além de elevada quantidade de abrigos artificiais. O local também é utilizado para o descarte de resíduos provenientes de obras realizadas no campus e para o estacionamento de ônibus e tratores destinados às atividades de manutenção da universidade.

A Mata dos Saguis, localizada nas proximidades do Centro de Biociências (CB), possui aproximadamente 15.000 m² e apresenta elevada diversidade de fauna e flora, desempenhando importante papel nas atividades de ensino, pesquisa e extensão. Considerada o último fragmento de Mata Atlântica com fitofisionomia de restinga existente na UFRN, abriga diversas espécies de fauna e flora (MELO, 2018).

Procedimentos metodológicos

O trabalho de campo foi realizado em duas etapas, totalizando seis excursões, com duração de cinco dias consecutivos cada. A primeira etapa ocorreu entre novembro de 2024 e junho de 2025, abrangendo os meses de novembro, dezembro e janeiro, correspondentes ao período seco, e fevereiro a junho, correspondentes ao período chuvoso. A segunda etapa ocorreu entre novembro de 2025 e abril de 2026, abrangendo

os meses de novembro, dezembro e janeiro, correspondentes ao período seco, e fevereiro a abril, correspondentes ao período chuvoso. As atividades foram realizadas no período diurno, das 8h às 17h. A amostragem dos répteis Squamata foi realizada nos três remanescentes elencados previamente, utilizando dois métodos complementares: busca ativa limitada por tempo e armadilhas de interceptação e queda (pitfall traps).

A busca ativa foi realizada por dois pesquisadores durante 30 minutos em cada área, percorrendo um transecto de aproximadamente 200 m. Foram inspecionados diferentes micro-habitats visualmente acessíveis, como sob e sobre o folhiço, areia, troncos caídos e em decomposição, troncos de árvores, raízes expostas, galhos e abrigos artificiais, conforme Martins e Oliveira (1998). Sempre que possível, os indivíduos foram fotografados. A coleta de exemplares ocorreu apenas quando houve dúvida na identificação da espécie, visando à confirmação taxonômica.

As armadilhas de interceptação e queda seguiram a metodologia proposta por Cechin e Martins (2000). Cada unidade amostral foi composta por quatro baldes de 20 litros enterrados ao nível do solo, dispostos em formato de "Y" e espaçados três metros entre si, interligados por cercas-guia confeccionadas com lona plástica de 60 cm de altura, destinadas a direcionar os animais aos recipientes. As armadilhas permaneceram ativas durante cinco dias consecutivos em cada campanha e foram inspecionadas diariamente, entre 8h e 17h.

Todos os indivíduos capturados foram fotografados e identificados em campo. A coleta de material testemunho foi restrita ao primeiro exemplar de cada espécie registrada e aos indivíduos cuja identificação não foi possível em campo. Após os procedimentos de registro, os demais exemplares foram imediatamente soltos no local de captura. Para cada registro foram anotados a data, o horário, as coordenadas geográficas, o método de amostragem, a área de coleta, o habitat e o micro-habitat, utilizando caderno de campo e receptor GPS.

Os dados foram organizados em planilhas e analisados no software R. Foram calculadas a riqueza de espécies, considerando o número de espécies registradas, e a abundância, correspondente ao número total de indivíduos amostrados. Para estimar a riqueza de espécies, foram utilizados os estimadores Chao 1, Jackknife 1, Jackknife 2 e Bootstrap. O Chao 1 considera a abundância de espécies raras, especialmente singletons e doubletons (CHAO, 1984). O Jackknife 1 utiliza as espécies registradas em apenas uma amostra, enquanto o Jackknife 2 considera aquelas presentes em uma ou duas amostras (HELTSHE; FORRESTER, 1983). O Bootstrap estima a riqueza com base na frequência de ocorrência das espécies nas amostras (SMITH; VAN BELLE, 1984). Esses estimadores foram utilizados para comparar a riqueza observada com a riqueza potencial da comunidade.

Para avaliar a similaridade na composição da fauna de Squamata entre as áreas, foi construída uma matriz de presença e ausência das espécies, utilizando os registros obtidos nas campanhas de campo deste estudo e os dados provenientes de levantamentos realizados no Parque Estadual das Dunas de Natal (PEDN), na Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLONA de Nísia Floresta) e no Centro de Ecologia e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA). A partir dessa matriz, foi calculado o índice de similaridade de Jaccard, considerando a presença ou ausência de cada espécie em cada área. O índice varia de 0 a 1, sendo que valores próximos a 0 indicam baixa

similaridade na composição de espécies, enquanto valores próximos a 1 indicam maior similaridade. A análise foi realizada no software R, permitindo comparar a composição da fauna de Squamata entre as áreas estudadas e as áreas utilizadas como referência.

Resultados e Discussões

A abundância total registrada durante este estudo foi de 305 indivíduos, distribuídos entre os diferentes remanescentes estudados. Entre as áreas amostradas, a mata da Reitoria apresentou a maior abundância, com 150 indivíduos, seguida pela Mata dos Saguis, com 95, e pela Mata da CAERN, com 50 indivíduos. Foram registradas 16 espécies de Squamata, distribuídas entre 16 famílias. As famílias que apresentaram maior riqueza foram Amphisbaenidae (Gray, 1865) e Gekkonidae (Gray, 1825), com 3 espécies. Tropiduridae (Wied, 1825), Teiidae (Gray, 1865) e Colubridae (Oppel, 1811) com 2 espécies. As demais famílias apresentaram menor riqueza, representadas na Fig. 2 e na Fig. 3, demonstrando a distribuição da riqueza de espécies entre as áreas. A maior riqueza foi encontrada na mata da Reitoria, com 12 espécies, a riqueza da mata da CAERN, com 8 espécies e a menor riqueza registrada na Mata dos saguis, com 5 espécies (Figuras 1 e 2).

A maior abundância absoluta geral registrada foi para Tropidurus hispidus (Spix,1825), com 138 indivíduos, representando aproximadamente 45% de todos os indivíduos registrados nas três áreas. Esta espécie foi particularmente abundante na Mata dos Saguis, onde foram registrados 67 indivíduos, correspondendo a cerca de 71% dos indivíduos dessa área. Na mata da Reitoria, foram registrados 56 indivíduos, enquanto na Mata da CAERN foram registrados 15 (Fig. 3). Este fato confirma a abundância maior de T. hispidus em áreas antropizadas e de bordas de remanescentes florestais, dada a sua fragilidade ecológica ou plasticidade, conforme apontado por Vanzolini, Ramos-Costa & Vitt (1980), Rodrigues (1987), Guedes et al (2014).

Outra espécie que apresentou elevada abundância foi Hemidactylus mabouia (Moreau de Jonnès, 1818), com 65 indivíduos registrados. A espécie foi mais abundante na mata da Reitoria (34 indivíduos), seguida pela Mata da CAERN (21), e pela Mata dos Saguis, com 10 indivíduos. Considerando que H. mabouia é uma espécies exótica invasora, sua maior ocorrência na mata da Reitoria pode ser justificada pela maior influência de estruturas construídas e à proximidade com áreas urbanizadas, uma vez que esta espécie é frequentemente associada a ambientes antrópicos (SOUSA & CAMPOS et al., 2014).

A maior abundância de indivíduos foi na estação seca em todas as áreas estudadas, a saber, Mata dos Saguis, 86 indivíduos na seca, contra 9 na chuvosa, sendo esta a maior diferença entre as estações. Na Mata da CAERN, foram 41 indivíduos na seca e 9 na chuvosa, enquanto na Reitoria, 84 e 66 indivíduos, respectivamente. A maior abundância de espécies na estação seca pode estar relacionada à maior riqueza de espécies originalmente habitantes de formações abertas, tais como, caatinga, cerrado e restingas (FREIRE, 1996; Guedes et al 2014). Já a riqueza apresentou menor variação entre as estações. A Reitoria teve a maior riqueza na estação chuvosa, com 9 espécies, enquanto na seca foram registradas 8 espécies. Na Mata da CAERN, foram registradas 4 espécies na chuvosa e 8 na seca, e na Mata dos Saguis foram registradas 4 espécies em

ambas as estações. Esses resultados mostram que, embora a riqueza tenha apresentado pouca variação em algumas áreas, a abundância foi maior durante a estação seca(Fig. 2).

A curva de acumulação de espécies apresentou aumento progressivo da riqueza em função do esforço amostral, com maior crescimento nas primeiras unidades amostrais e tendência de estabilização ao final da amostragem. A riqueza observada alcançou 16 espécies, correspondendo ao número de espécies registradas nas áreas estudadas. O estimador Chao 1, baseado principalmente na ocorrência de espécies raras, apresentou valor próximo ao observado, indicando baixa proporção de espécies potencialmente não detectadas. O Jackknife 1 apresentou uma estimativa superior, relacionada à presença de espécies registradas uma única vez, enquanto o Jackknife 2 apresentou a maior estimativa de riqueza, por ser mais sensível à ocorrência de espécies raras registradas em poucas amostras. O Bootstrap também apresentou valor próximo à riqueza observada, reforçando a elevada representatividade da amostragem. Dessa forma, a proximidade entre a riqueza observada e os valores estimados, associada à tendência de estabilização das curvas, indica que o esforço amostral foi suficiente para caracterizar a maior parte da riqueza de Squamata nas áreas estudadas (Fig. 5).

Os índices de Jaccard calculados mostraram baixa similaridade na composição faunística de espécies de Squamata ocorrentes no Campus e em outras áreas florestadas próximas. A maior similaridade foi observada entre UFRN e CEPEMA/Parque da Cidade (J = 0,52), indicando que essas áreas compartilham uma parcela maior de suas espécies. Em seguida, FLONA-NF e PEDN apresentaram similaridade de (J = 0,42), enquanto as demais comparações apresentaram valores entre 0,25 e 0,36. A menor similaridade ocorreu entre UFRN e FLONA-NF (J = 0,25). O dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA, apresentado na Figura 5, que reforçou esse padrão, formando dois agrupamentos principais: UFRN com CEPEMA e PEDN com FLONA-NF. Esses resultados indicam que, apesar do compartilhamento de algumas espécies entre as áreas, existem diferenças na composição da comunidade de Squamata, possivelmente relacionadas às características ambientais e ao grau de conservação e fragmentação de cada local (Fig. 6).

Quando os dados atuais são comparados com os levantamentos anteriores realizados no campus, como Sales (2009), Cavalcanti (dados não publicados), percebe-se que a fauna registrada pode ser maior do que aquela encontrada somente durante o período deste estudo. Isso mostra a importância de juntar diferentes levantamentos para conhecer melhor a composição de Squamata do campus, já que algumas espécies podem não ser registradas em determinados períodos ou métodos de amostragem.

A presença de diferentes espécies de Squamata nos remanescentes estudados reforça a importância dessas áreas para a manutenção da fauna em meio à paisagem urbana. Estudos realizados em áreas urbanas de Mata Atlântica também destacam a importância desses ambientes para a conservação de répteis, principalmente diante das ameaças relacionadas à urbanização (SILVA; SALES; FREIRE, 2024).

A fragmentação também pode afetar as espécies de maneiras diferentes. Espécies mais generalistas, como T. hispidus e H. mabouia, parecem apresentar maior facilidade para permanecer em áreas modificadas, enquanto espécies mais relacionadas a ambientes florestados podem ser mais dependentes da manutenção da vegetação. No estudo de

Sales et al. (2009), por exemplo, Coleodactylus natalensis Freire, 1999, foi encontrado associado a áreas com maior quantidade de folhiço e vegetação mais densa.

Assim, mesmo sendo pequenos fragmentos inseridos em uma área bastante urbanizada, os remanescentes do Campus da UFRN ainda apresentam importância para a conservação dos Squamata. A presença de espécies de áreas abertas, espécies generalistas e espécies associadas a ambientes florestados mostra que esses locais apresentam diferentes condições ambientais. Dessa forma, a conservação desses fragmentos pode contribuir para a manutenção da diversidade de répteis no campus e na região.

Conclusão

A composição de espécies de Répteis Squamata nestes remanescentes florestais do Campus da UFRN ainda desempenha um papel importante na conservação da diversidade dessas espécies, muito especialmente da espécie endêmica do RN e ameaçada de extinção, C. natalensis, apesar dos processos de urbanização e fragmentação. A riqueza de espécies registrada indica que esses fragmentos funcionam como refúgio para a herpetofauna, embora esteja submetida aos efeitos da fragmentação e da ação humana.

A maior ocorrência de Tropidurus hispidus e Hemidactylus mabouia nas áreas mais urbanizadas sugere que a urbanização influencia a composição das comunidades, favorecendo espécies mais generalistas e adaptadas às mudanças do ambiente.

As diferenças encontradas entre as áreas, principalmente nos valores de diversidade, também mostram que cada fragmento apresenta características próprias que podem influenciar a composição da fauna. A presença de espécies compartilhadas entre áreas abertas e florestadas reforça ainda a importância da heterogeneidade desses ambientes para a comunidade de Squamata.

A comparação com levantamentos anteriores efetuados nestas mesmas áreas, como Sales (2009), Cavalcanti (dados não publicados), também mostram que o conhecimento sobre a fauna de répteis de remanescentes florestais do Campus pode aumentar quando diferentes estudos e períodos de amostragem são considerados. Assim sendo, a continuidade do monitoramento é importante para acompanhar possíveis mudanças na composição da comunidade ao longo do tempo.

Em suma, apesar da fragmentação e das alterações causadas pela urbanização, os remanescentes florestais do Campus da UFRN ainda contribuem para a manutenção da fauna de répteis Squamata. A conservação dessas áreas é importante para manter a diversidade de espécies e a heterogeneidade ambiental dentro do campus, principalmente diante da crescente ocupação e alteração dos fragmentos.

Referências

ALMEIDA-CORRÊA, T. et al. Effect of environmental parameters on squamate reptiles in an urban forest fragment in central Amazonia. Acta Amazonica, v. 50, n. 3, p. 239–245, 2020. DOI: 10.1590/1809-4392201904423.

BELASEN, A. M. et al. Habitat fragmentation in the Brazilian Atlantic Forest is associated with erosion of frog immunogenetic diversity and increased fungal infections. Immunogenetics, v. 74, p. 431–441, 2022. DOI: 10.1007/s00251-022-01252-x.

CECHIN, S. Z.; MARTINS, M. Eficiência de armadilhas de queda (pitfall traps) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 17, p. 729–740, 2000.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistics, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

COLWELL, R. K.; MAO, C. X.; CHANG, J. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. Ecology, v. 85, n. 10, p. 2717–2727, 2004. DOI: 10.1890/03-0557.

DUBEUX, Marcos Jorge M. et al. Amphisbaenians and lizards of the Pernambuco Endemism Center: species richness, sampling gaps, and conservation status in one of the most threatened regions of the Atlantic Forest. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, e20240284, 2025. DOI: 10.1590/0001-3765202520240284.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 34, p. 487–515, 2003. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419.

FREIRE, Eliza Maria Xavier. Espécie nova de Coleodactylus Parker, 1926 das dunas de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, com notas sobre suas relações e dicromatismo sexual no gênero (Squamata, Gekkonidae). Boletim do Museu Nacional. Nova Série, Zoologia, Rio de Janeiro, n. 399, p. 1–14, 1999.

FREIRE, E. M. X. et al. Mata Atlântica de Alagoas: herpetofauna ameaçada e estratégias de conservação. In: LUZ, Vera (org.). Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada da Mata Atlântica Nordestina. 2. ed. Brasília, DF: ICMBio, 2019. p. 113–132.

HELTSHE, J. F.; FORRESTER, N. E. Estimating species richness using the Jackknife procedure. Biometrics, v. 39, n. 1, p. 1–11, 1983.

LUZ, Vera. Plano de Ação Nacional para a Conservação da Herpetofauna Ameaçada da Mata Atlântica Nordestina. 2. ed. [S. l.: s. n.], 2019. 252 p. v. 2.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

RIBEIRO, L. B.; FREIRE, E. M. X. Lagartos como bioindicadores: testando metodologia de avaliação da qualidade ambiental de caatingas e áreas florestadas. In: FREIRE, E. M. X.; CÂNDIDO, G. A.; AZEVEDO, P. V. (org.). Múltiplos olhares sobre o semiárido brasileiro: perspectivas interdisciplinares. Natal: EDUFRN, 2011. p. 145–186.

RIBEIRO, L. B.; FREIRE, E. M. X. Trophic ecology and foraging behavior of Tropidurus hispidus and Tropidurus semitaeniatus (Squamata, Tropiduridae) in a Caatinga area of northeastern Brazil. Iheringia. Série Zoologia, v. 101, n. 3, p. 225–232, 2011. DOI: 10.1590/S0073-47212011000200010.

RODRIGUES, M. T. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos Tropidurus do grupo torquatus ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). Arquivos de Zoologia, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 105–230, 1987.

SALES, R. F. D.; LISBOA, C. M. C. A.; FREIRE, E. M. X. Répteis squamata de remanescentes florestais do Campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil. Cuadernos de Herpetología, v. 23, p. 77–88, 2009.

SILVA, Holda Ramos da; SALES, Raul Fernandes Dantas; FREIRE, Eliza Maria Xavier. Local ecological knowledge about reptiles and cryptic lizard in urban park in the Atlantic Forest. Ambiente & Sociedade, São Paulo, v. 27, e00057, 2024. DOI: 10.1590/1809-4422asoc00572vu27L3OA.

SMITH, E. P.; VAN BELLE, G. Nonparametric estimation of species richness. Biometrics, v. 40, n. 1, p. 119–129, 1984.

SOARES, Andrey Luiz Cavalcanti; MELO, Lucas José Antonio Pereira de; SILVA, Renan Carvalho da; MASCARENHAS JUNIOR, Paulo Braga. O impacto da perda de habitat sobre a herpetofauna na Mata Atlântica do Nordeste brasileiro. Revista Universitária Brasileira, v. 2, n. 2, p. 18–26, 2024.

SOUSA, J. G. G. et al. Helmintos e pentastomídeos de dois lagartos sinantrópicos, Hemidactylus mabouia e Phyllopezus pollicaris, de uma área urbana da região Nordeste do Brasil. Brazilian Journal of Biology, v. 74, n. 4, p. 943–948, 2014. DOI: 10.1590/1519-6984.01413.

SOUZA, Naziel Santos; CAMPOS, Carlos Eduardo Costa. Geographic Distribution: Tropidurus hispidus (Peters' lava lizard). Herpetological Review, v. 45, n. 1, p. 93, 2014.

SUMANASEKARA, V. D. W.; DISSANAYAKE, D. M. M. R.; SENEVIRATNE, H. T. J. Review on use of amphibian taxa as a bio-indicator for watershed health and stresses. In: NBRO Symposium Proceedings. 2015.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 132–138, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE. Mata dos Saguis da UFRN promove conhecimento, conservação e educação ambiental. Natal: UFRN, 2024.

VANZOLINI, Paulo Emilio; RAMOS-COSTA, Ana Maria M.; VITT, Laurie J. Répteis das Caatingas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1980. 161 p.

Anexos



Figura 1. Vista aérea do Campus Central da UFRN, com destaque em vermelho para as áreas inventariada



Figura 2. Riqueza de espécies de Squamata nas áreas amostradas durante as estações chuvosas e secas.



Figura 3. Gráfico com a riqueza total de espécies.



Figura 4. Abundância de espécies por área. A) Mata da Reitoria. B) Mata dos Saguis. C) Mata da CAERN. D) Abundância e frequência relativa das espécies.



Figura 5. Curvas de acumulação de espécies observadas e estimadas pelos estimadores Chao 1, Jackknife 1, Jackknife 2 e Bootstrap, em função do número de campanhas.



Figura 6. Gráfico de linha (Curva de acumulação de espécies), com faixa de intervalo de confiança (estimadores: Chao1, Jackknife 1, Jackknife 2 e Bootstrap)



Figura 7. Similaridade faunística de Squamata entre áreas de amostragem pelo índice de Jaccard. A) Matriz de similaridade. B) Dendrograma de agrupamento UPGMA.



Figura 8. Amphisbaena heathi. Fonte: Vinicius Thawaan.



Figura 9. (A) Epictia borapeliotes; (B) Apostolepis cearensis. Fonte: Stéphane Beatriz



Figura 10. (A) Tropidurus hispidus; (B) Iguana iguana; (C) Hemidactylus mabouia; (D) Coleodactylus natalensis; (E) Brasiliscincus heathi; (F) Micrablepharus maximiliani; (G) Gymnodactylus geckoides; (H) Ameivula ocellifera; (I) Diploglossus lessonae. Fon



Tabela 1. Espécies de Squamata registradas na área amostrada do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), durante os anos de 2025 e 2026.1. UFRN-CH = Coleção Herpetológica, UFRN; BA = busca ativa; PF = pitfalls; AR = areia; AA

CÓDIGO: SB0001

AUTOR: ANTHONY GABRIEL JUSTINO DE MEDEIROS

ORIENTADOR: RAFAEL WESLEY BASTOS

TÍTULO: Agroquímicos podem selecionar resistência a antifúngico clínico em Candida auris?

Resumo

Candida auris é uma levedura patogênica emergente que apresenta elevadas taxas de resistência antifúngica, especialmente ao fluconazol (FCZ). Um dos principais desafios relacionados a essa espécie é compreender a origem e evolução de sua resistência. Uma hipótese sugere que o uso extensivo de agroquímicos, como azóis agrícolas, possa selecionar isolados resistentes no ambiente, as quais posteriormente infectariam humanos. Assim, este estudo teve como objetivo investigar se a exposição ao fungicida agrícola tebuconazol (TBZ) pode induzir resistência cruzada ao FCZ, considerando também o impacto da temperatura nesse processo. Inicialmente, a análise de 39 isolados clínicos revelou que 94% dos resistentes ao FCZ exibiam resistência ao TBZ, indicando alta taxa de resistência cruzada. Em seguida, um isolado clínico sensível a ambas as drogas foi exposto a concentrações fixas de TBZ, a 30 °C e 37 °C. Observou-se aumento progressivo da resistência a ambos os compostos, sendo este mais proeminente em temperatura elevada; contudo, essa resistência desapareceu após cultivo em meio sem TBZ, caracterizando fenômeno transitório. Distintamente, quando realizada pressão seletiva com aumento gradual da concentração de TBZ, a resistência cruzada se tornou estável e persistiu após 30 subcultivos sem o TBZ. Assim, foi demonstrado que é possível selecionar mutantes resistentes a antifúngicos clínicos através da exposição a antifúngicos agrícolas, caracterizando o processo de resistência cruzada.

Palavras-chave: micologia; fungicidas; temperatura

TITLE: Can agrochemicals select for clinical antifungal resistance in Candida auris?

Abstract

Candida auris is an emerging pathogenic yeast exhibiting high rates of antifungal resistance, particularly to fluconazole (FCZ). A major challenge regarding this species is understanding the origin and evolution of its resistance. One hypothesis suggests that the extensive use of agrochemicals, such as agricultural azoles, may select for resistant isolates in the environment, which subsequently infect humans. Thus, this study aimed

to investigate whether exposure to the agricultural fungicide tebuconazole (TBZ) could induce cross-resistance to FCZ, while also considering the impact of temperature on this process. Initially, an analysis of 39 clinical isolates revealed that 94% of those resistant to FCZ also exhibited resistance to TBZ, indicating a high rate of cross-resistance. Subsequently, a clinical isolate susceptible to both drugs was exposed to fixed concentrations of TBZ at 30°C and 37°C. A progressive increase in resistance to both compounds was observed—more pronounced at the higher temperature—but this resistance disappeared after cultivation in a TBZ-free medium, characterizing a transient phenomenon. In contrast, when selective pressure was applied using gradually increasing TBZ concentrations, the cross-resistance became stable and persisted after 30 subcultures without TBZ. Thus, it was demonstrated that mutants resistant to clinical antifungals can be selected through exposure to agricultural antifungals, characterizing a process of cross-resistance.

Keywords: mycology; fungicides; temperature

Introdução

Candida auris, atualmente também reconhecida como Candidozyma auris (Satoh et al., 2009; Liu et al., 2024), é uma espécie leveduriforme patogênica, que vem impactando significativamente a saúde pública desde sua descoberta em 2009. Alguns isolados demonstram elevada capacidade de causar surtos hospitalares, envolvendo infecções invasivas graves, com taxas de mortalidade de até 50%. Isso levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considerá-la um alvo crítico para o desenvolvimento de novos antifúngicos (Semreen et al., 2019; WHO, 2022; ANVISA, 2025). O tratamento das infecções fúngicas invasivas é limitado pela escassez de classes de antifúngicos disponíveis. Na prática clínica, apenas três grupos de drogas são rotineiramente empregados: azóis, polienos e equinocandinas (Preda et al., 2024). No entanto, C. auris frequentemente apresenta resistência a uma ou mais dessas classes (Chowdhary et al., 2023). Destaca-se que a maioria das isolados é resistente ao fluconazol (FCZ), com taxas que podem chegar a 97% em determinados clados, enquanto cerca de 20% também exibem resistência ao polieno anfotericina B. Alarmantemente, já foram descritos isolados pan-resistentes a todas as opções terapêuticas disponíveis (Da Silva et al., 2025). Embora a resistência a equinocandinas e à anfotericina B seja preocupante, a elevada frequência de resistência ao FCZ tem relevância clínica marcante, visto que este é o antifúngico mais utilizado no mundo (Bastos et al., 2021). Os mecanismos moleculares responsáveis por essa resistência têm sido progressivamente elucidados, mas ainda não se compreende plenamente como eles evoluíram em C. auris (Preda et al., 2024). Uma hipótese, proposta por Casadevall et al. (2019), sugere que a resistência clínica ao FCZ pode ter emergido a partir de resistência cruzada com fungicidas agrícolas (agroquímicos), que compartilham mecanismos de ação semelhantes. Nesse contexto, isolados ambientais inicialmente sensíveis poderiam ter sido expostos a agroquímicos azólicos, selecionando mutantes capazes de resistir ao FCZ (Casadevall et al. 2019; Bastos et al., 2021). Evidências crescentes sustentam essa hipótese. isolados resistentes de C. auris já foram isoladas de ambientes não clínicos, incluindo frutas como maçãs, com isolados tanto sensíveis como resistentes a azóis (Yadav et al., 2022). Essas culturas agrícolas são frequentemente tratadas com fungicidas, o que sugere um possível elo entre o uso de agroquímicos e a seleção de resistência (Yadav et al., 2022). Além disso, os azóis, inibidores da biossíntese de ergosterol, lipídio essencial da

membrana plasmática fúngica, são amplamente empregados tanto na medicina quanto na agricultura (Chowdhary et al., 2023). Dessa forma, o mesmo mecanismo adaptativo que confere resistência ao azol agrícola poderia conferir resistência aos azóis clínicos. Esse fenômeno já foi comprovado em outros fungos, como Aspergillus fumigatus, em que a exposição a fungicidas agrícolas seleciona mutantes resistentes aos azóis utilizados em humanos (Bastos et al., 2021). Outro fator relevante em C. auris, é sua notável termotolerância. Essa levedura é capaz de crescer em temperaturas superiores a 40 °C, um traço incomum entre os fungos patogênicos, que pode estar relacionado à sua capacidade de infectar humanos. Nesse sentido, o aumento das temperaturas globais, intensificado nas últimas décadas, pode estar contribuindo não apenas para a disseminação dessa espécie, mas também para a seleção de isolados resistentes aos antifúngicos (Casadevall et al., 2019). Diante desse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar se a evolução da resistência aos azóis clínicos em C. auris pode ser induzida por exposição a azóis de uso ambiental.

Metodologia

Micro-organismos e condições de cultivo

Utilizou-se 39 isolados de Candida auris pertencentes à coleção do Grupo de Pesquisa em Interações Microbianas (GPIM) do Centro de Biociências da UFRN. Esses isolados são oriundos de coleções-padrão — como a Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) do Westerdijk Institute (Países Baixos) — e de surtos globais, incluindo amostras do Brasil depositadas no Herbário URM Pe. Camille Torrend. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) suplementado com 20% de glicerol até o momento de sua utilização.

Desenho Experimental

Inicialmente, investigou-se a existência de resistência cruzada natural entre o tebuconazol (TBZ) e o fluconazol (FCZ) nos 39 isolados clínicos de C. auris por meio de testes de sensibilidade antifúngica.

Em seguida, para testar a hipótese de que o TBZ poderia selecionar resistência cruzada ao FCZ, conduziram-se duas abordagens experimentais. Na primeira, o isolado C. auris CA28 (da Coreia do Sul) foi cultivado, em duplicata, em meio com concentrações fixas de TBZ durante dez passagens sucessivas. Na segunda, o mesmo isolado foi cultivado em concentrações progressivamente crescentes de TBZ até o limite máximo de crescimento.

Ao longo de ambas as metodologias, realizaram-se testes de sensibilidade ao TBZ e ao FCZ para monitorar as alterações na resposta antifúngica em comparação com células não expostas ao agroquímico. Por fim, a estabilidade dessas alterações foi avaliada cultivando-se as populações previamente expostas em meio livre do composto, com novos testes de sensibilidade para ambos os azóis ao final.

Testes de sensibilidade aos antifúngicos

O perfil de sensibilidade foi determinado pelo teste de microdiluição em caldo, visando estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM), conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). A sensibilidade foi avaliada frente ao antifúngico clínico FCZ e ao azólico agrícola TBZ em faixas de concentração entre 0,125 e 64,0 µg/mL. As CIMs foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico (CLSI, 2017; Bastos et al., 2025).

Em ensaios específicos, quantificou-se o crescimento lendo a densidade óptica (600 nm) em uma leitora de microplacas após a incubação. A partir desses dados, construíram-se heatmaps baseados na porcentagem de crescimento em relação ao controle positivo (100%), utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.

Para o FCZ, os isolados foram classificados utilizando os pontos de corte do Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2025): CIMs ≥ 32,0 µg/mL foram consideradas resistentes. Como não há pontos de corte clínicos para o TBZ, adotou-se o critério de Bastos et al. (2025), no qual isolados com CIM ≥ 8,0 µg/mL são considerados resistentes, valor que diferencia as cepas com e sem mecanismos de resistência.

Padronização do inóculo e determinação da CIM antes da adaptação

O isolado clínico C. auris CA28, previamente sensível ao TBZ (1 µg/mL) e ao FCZ (1 µg/mL), foi recuperado do estoque e cultivado em placas de ágar Yeast-Peptone-Dextrose (YPD) a 30 °C ou 37 °C por 48 horas. Em seguida, colônias foram transferidas para 1 mL de caldo YPD e incubadas por mais 24 horas nas mesmas temperaturas. O inóculo foi ajustado por densidade óptica (OD600nm) para 2×10^5 UFC/mL e inoculado em caldo YPD puro ou suplementado com TBZ (Eagan et al., 2022).

Exposição de C. auris a concentrações fixas de tebuconazol

O protocolo de exposição gradual foi adaptado de Eagan et al. (2022). As culturas foram inoculadas em microtubos contendo YPD ou YPD + TBZ a 0,5×CIM (0,5 µg/mL) e incubadas por 48 horas (30 °C ou 37 °C). Após o crescimento, 1 µL de cada cultura foi transferido para YPD puro ou YPD + TBZ a 16×CIM (16,0 µg/mL), seguido de nova incubação. Esse processo foi repetido por dez passagens sucessivas, em duplicata.

A sensibilidade a ambos os azóis foi reavaliada nas passagens 1, 5 e 10. Culturas expostas ao TBZ foram denominadas "Adaptadas ao Tebuconazol" (A), e aquelas mantidas sem o agroquímico, "Não Adaptadas" (NA). Após as dez passagens, as culturas adaptadas foram repicadas em YPD sem TBZ por mais dez passagens (grupo "10p") para avaliar se o aumento da CIM era uma característica estável ou transitória. A ocorrência de resistência cruzada foi definida pelo aumento da CIM acima dos pontos de corte para ambas as drogas.

Exposição de C. auris a concentrações crescentes de tebuconazol

O segundo método, adaptado de Bastos et al. (2019), consistiu no cultivo sequencial em concentrações progressivamente maiores de TBZ. As culturas foram inoculadas em YPD com TBZ e incubadas a 30 °C ou 37 °C, com a concentração do antifúngico dobrando a cada 24 horas. O processo seguiu até a máxima concentração que permitisse o crescimento fúngico, ou até o limite de 256 µg/mL.

Para avaliar a estabilidade da resistência cruzada, as populações previamente expostas ao limite de TBZ foram cultivadas em YPD sem antifúngico por 30 passagens sucessivas. Novas determinações de CIM foram realizadas a cada dez passagens, gerando os grupos de análise "10p", "20p" e "30p".

Resultados e Discussões

Isolados clínicos de C. auris resistentes ao fluconazol também são resistentes ao tebuconazol

Foram avaliados 39 isolados de C. auris da coleção quanto à sensibilidade ao FCZ e ao agroquímico TBZ, com determinação da CIM individual para cada composto (Figura 1). No total, 41% (16/39) dos isolados mostraram resistência ao FCZ (CIM ≥ 32,0 µg/mL), enquanto 38,5% (15/39) foram resistentes ao TBZ (CIM ≥ 8,0 µg/mL) (Figura 1). A análise de correlação revelou que 15 dos 16 isolados resistentes ao FCZ (≈ 94%) também apresentaram resistência ao TBZ. A única exceção foi o isolado C. auris CA30, que, embora resistente ao FCZ, não foi classificado como resistente ao TBZ (CIM de 4,0 µg/mL); contudo, exibiu um valor elevado de CIM, ficando apenas uma diluição abaixo do ponto de corte adotado (8,0 µg/mL).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou, em um estudo com quase 400 isolados, que a taxa de resistência cruzada entre FCZ e TBZ em outras espécies do gênero Candida (C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis) é inferior a 10% (Bastos et al., 2025). Dessa forma, fica evidente a característica inédita dos isolados clínicos de C. auris em relação à resistência cruzada, achados que evidenciam um padrão marcante para essa espécie.

Exposição a concentrações fixas de tebuconazol aumenta a resistência ao fluconazol em C. auris

Após confirmar que a resistência cruzada representa um fator relevante em isolados clínicos de C. auris, testou-se a hipótese de que a exposição ao TBZ poderia selecionar resistência ao FCZ. Para isso, utilizou-se o isolado CA28, originalmente sensível a ambas as drogas (Figura 1), o qual foi cultivado em concentrações fixas de TBZ. Sua sensibilidade foi monitorada ao longo das passagens e comparada à do tratamento controle, que não teve exposição ao agroquímico.

Os resultados mostraram que a CIM dos controles permaneceu constante em todos os contextos experimentais (Figura 2). Já nos isolados previamente expostos ao TBZ, a CIM variou de acordo com a temperatura de cultivo. A 30 °C, a CIM para o TBZ atingiu valores de resistência (≥ 8,0 µg/mL) já na primeira passagem, aumentando progressivamente até 16,0 µg/mL na 10ª passagem (Figura 2). Para o FCZ, o aumento foi ainda mais acentuado: a replicata que se tornou resistente ao TBZ também apresentou resistência ao FCZ (≥ 8,0 µg/mL) desde a primeira exposição, alcançando valores acima da maior concentração testada (≥ 64,0 µg/mL) na 10ª passagem (Figura 2).

A seleção de resistência foi favorecida na temperatura mais elevada, que mimetiza a condição corporal humana (37 °C). Nesse cenário, uma das replicatas tornou-se resistente ao TBZ, enquanto ambas desenvolveram resistência ao FCZ. É importante destacar que, embora uma das replicatas não tenha sido classificada como resistente ao TBZ, sua CIM permaneceu elevada (4,0 µg/mL), próxima ao ponto de corte (Figura 2).

Coletivamente, esses dados demonstram que a exposição a concentrações fixas de TBZ pode induzir resistência cruzada ao FCZ, corroborando a hipótese inicial. No entanto, não estava claro se essa resistência seria permanente, decorrente de mutações genéticas herdáveis, ou transitória, resultante de alterações epigenéticas e fisiológicas momentâneas, manifestadas apenas durante o contato prévio com a droga (Bastos et al., 2017).

Para investigar essa questão, células previamente adaptadas ao crescimento em TBZ foram subcultivadas dez vezes em meio sem o agroquímico. Os controles foram denominados “não adaptados” (NA), as culturas expostas ao TBZ, “adaptadas” (A), e as adaptadas subcultivadas na ausência da droga, “10p”. Ao final, determinou-se a CIM para ambas as drogas.

Conforme apresentado nas Figuras 3 e 4, tanto a adaptação a 30 °C quanto a 37 °C resultou em resistência cruzada transitória (não gerou um fenótipo de resistência permanente) em C. auris CA28 (2), uma vez que as culturas 10p retornaram à sensibilidade (CIM < 8,0 µg/mL para TBZ e < 32,0 µg/mL para FCZ) após os subcultivos sem o agroquímico (Figura 3).

Exposição a concentrações crescentes de tebuconazol induz resistência cruzada permanente ao fluconazol em C. auris

Considerando que a exposição a concentrações fixas de TBZ induziu resistência cruzada temporária, avaliou-se se o mesmo fenômeno ocorreria caso as células fossem expostas a concentrações crescentes do agroquímico. A 30 °C, as culturas conseguiram crescer até a concentração de 128,0 µg/mL de TBZ, enquanto a 37 °C toleraram até 256,0 µg/mL. Após a adaptação, as culturas NA (não expostas, controle) e A (expostas ao TBZ) foram submetidas ao protocolo de determinação da CIM.

Na menor temperatura (30 °C), uma das culturas adaptadas tornou-se resistente ao TBZ (C. auris CA28-1), mas ambas apresentaram resistência ao FCZ. Já a 37 °C, as duas replicatas adaptadas desenvolveram resistência tanto ao TBZ quanto ao FCZ (Figuras 5 e 6).

Para avaliar a estabilidade dessa resistência, as culturas adaptadas foram subcultivadas dez vezes em meio sem droga antes de um novo teste de sensibilidade (culturas 10p). Observou-se que as culturas adaptadas a 30 °C retornaram à sensibilidade, demonstrando resistência cruzada transitória. Em contraste, a 37 °C, a resistência se manteve nas culturas 10p, persistindo inclusive após 20 (20p) e 30 (30p) subcultivos consecutivos.

Dessa forma, as culturas C. auris CA28 (1 e 2) apresentaram resistência cruzada permanente quando adaptadas a 37 °C, sugerindo que a exposição a concentrações

crescentes de TBZ seleciona mutações responsáveis por mecanismos estáveis de resistência ao antifúngico clínico FCZ (Figuras 5 e 6).

Conclusão

Este trabalho possui caráter inédito ao comprovar experimentalmente a hipótese de que a exposição ao fungicida agrícola tebuconazol (TBZ) pode selecionar resistência cruzada ao antifúngico clínico fluconazol (FCZ) em Candida auris. Inicialmente, constatou-se que a taxa de resistência cruzada entre FCZ e TBZ atinge 94% dos isolados clínicos avaliados. Esse valor é extremamente elevado quando comparado ao observado em outros fungos, o que reforça a singularidade e a importância epidemiológica desse achado. Em seguida, demonstrou-se que a exposição consecutiva ao TBZ pode induzir o aumento progressivo das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) frente ao próprio fungicida e, em diversos casos, resultar em resistência cruzada ao FCZ em isolados de C. auris inicialmente sensíveis. Esse fenômeno foi mais acentuado em condições de temperatura elevada (37 °C), indicando que o estresse térmico atua como um fator adicional na seleção de resistência antifúngica. Nos casos de exposição a concentrações crescentes de TBZ, foram selecionadas células com resistência permanente ao FCZ, sugerindo o surgimento de mutações estáveis. Essa observação consolida a premissa de que fungicidas agrícolas podem selecionar mecanismos de resistência com impacto clínico direto. A relevância desses achados é ampliada pelo contexto de mudanças climáticas globais, no qual o aumento da temperatura ambiental pode facilitar a emergência de microrganismos capazes de tolerar condições próximas às do corpo humano. Ao demonstrar que o estresse térmico eleva a probabilidade de seleção de resistência, estes resultados reforçam as teorias que associam alterações ambientais à emergência de C. auris como patógeno humano. Atualmente, novos experimentos estão em andamento para compreender os mecanismos moleculares de resistência selecionados pela exposição ao TBZ e verificar se eles coincidem com aqueles observados em isolados clínicos naturalmente resistentes. Essa etapa será fundamental para reforçar a hipótese de que os agroquímicos não apenas favorecem a resistência no ambiente, mas também podem explicar parte do fenômeno clínico documentado globalmente. Além disso, o mesmo protocolo está sendo aplicado a outros isolados de C. auris para determinar se essa resposta representa uma característica individual da cepa CA28 ou se corresponde a um traço adaptativo mais amplo da espécie. Coletivamente, este estudo fornece evidências que conectam diretamente o uso de fungicidas agrícolas à seleção de resistência cruzada em C. auris, ressaltando a necessidade urgente de integrar a perspectiva de Saúde Única (One Health) no manejo e regulamentação de antifúngicos ambientais e clínicos.

Referências

ANVISA. Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa nº 01/2023 - Assunto: Confirmação de caso de Candida auris em Hospital de São Paulo. 22 jan. 2025. BASTOS, R. W. et al. From the environment to the host: how non-azole agrochemical exposure affects the

antifungal susceptibility and virulence of Cryptococcus gattii. Science of the Total Environment, v. 681, p. 516–523, 2019. BASTOS, R. W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. PLoS Pathogens, v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021. BASTOS, R. W. et al. Antifungal resistance in yeasts from One Health perspective: A Brazilian study. Science of The Total Environment, v. 973, p. 179139, 2025. CASADEVALL, A.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROBERT, V. On the emergence of Candida auris: climate change, azoles, swamps, and birds. mBio, v. 10, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1128/mBio.01397-19. Acesso em: 22 jan. 2025. CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antifungal susceptibility testing for Candida auris. Disponível em:https://www.cdc.gov/candida-auris/hcp/laboratories/antifungal-susceptibility-testing.html. Acesso em: 4 fev. 2025. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard—third edition. Wayne: CLSI, 2017. (CLSI document M27-A3). CHOWDHARY, A.; JAIN, K.; CHAUHAN, N. Candida auris genetics and emergence. Annual Review of Microbiology, v. 77, n. 1, p. 583–602, 2023. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032521-015858. DA SILVA, K. J. G. et al. How does antifungal resistance vary in Candida (Candidozyma) auris and its clades? Quantitative and qualitative analyses and their clinical implications. Clinical Microbiology and Infection, [S.l.], v. 31, n. 7, p. 1146-1156, jul. 2025. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.04.003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40216246. Acesso em: 25 jun. 2025. EAGAN, Justin L. et al. Inadvertent selection of a pathogenic fungus highlights areas of concern in human clinical practices. Journal of Fungi, v. 8, n. 2, p. 157, 2022. LIU, F. et al. Phylogenomic analysis of the Candida auris–Candida haemuli clade and related taxa in the Metschnikowiaceae, and proposal of thirteen new genera, fifty-five new combinations and nine new species. Persoonia, v. 52, p. 22–43, 2024. PREDA, M. et al. Pathogenesis, prophylaxis, and treatment of Candida auris. Biomedicines, v. 12, n. 3, p. 561, 2024. SATOH, Kazuo et al. Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. Microbiology and Immunology, v. 53,n. 1, p. 41–44, 2009. SEMREEN, M. H. et al. Metabolic profiling of Candida auris, a newly-emerging multi-drug resistant Candida species, by GC-MS. Molecules (Basel, Switzerland), v. 24, n. 3, p. 399, 2019. YADAV A, Jain K, Wang Y, et al. Candida auris on Apples: Diversity and Clinical Significance. mBio. 2022;13(2):e0051822. doi:10.1128/mbio.00518-22 WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 25 out. 2022. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241. Acesso em: 22 jan. 2025

Anexos



FIGURA 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM, em µg/mL) de 39 isolados clínicos de C. auris, provenientes de diferentes origens geográficas, frente a fluconazol (FCZ) e tebuconazol (TBZ). Em vermelho: resultados classificados como resistentes



Figura 2: Resultados das CIMs do isolado de C. auris CA 28



Figura 3: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) para fluconazol e tebuconazol



Fig 4. testes de susceptibilidade aos antifúngicos, para determinação da CIM para TBZ e FCZ, nas temperaturas de 30ºC e 37ºC



Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) para fluconazol e tebuconazol, de cada um dos grupos de colônias dos isolados após a adaptação em concentrações crescentes



determinação da CIM para TBZ e FCZ, nas temperaturas de 30ºC e 37ºC, antes (não adaptado - NA), após os experimentos de adaptação (adaptado - A) em concentrações crescentes de TBZ

CÓDIGO: SB0006

AUTOR: JONAS GALILEU FERREIRA DE AQUINO

COAUTOR: MARIA KAROLAYNNE DA SILVA

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: Análise imunoinformática comparativa do emergente Phlebovirus mukawaense: variações dependentes do genótipo nos epítopos de células T e B

Resumo

O *Phlebovirus mukawaense* (MKWV) é um vírus emergente associado a carrapatos, detectado no Japão, na China e na Rússia, com potencial zoonótico ainda não plenamente caracterizado. Este estudo aplicou uma abordagem comparativa de imunoinformática às glicoproteínas de envelope Gn e Gc dos genótipos Mukawa e Gomselga, visando priorizar candidatos vacinais sensíveis à diversidade viral. Foram preditos epítopos de células B e T restritos ao MHC classes I e II, seguidos por análises de processamento antigênico, imunogenicidade, antigenicidade, alergenicidade, toxicidade, indução de citocinas e cobertura populacional por HLA. Foram identificadas 35 regiões de células B na sequência de referência e 29 em Gomselga. Os candidatos de MHC-I aumentaram de 15 para 17, com três peptídeos totalmente conservados (KFAIVDEEF, QLDWGTISI e YPVASIERV), enquanto os de MHC-II diminuíram de sete para cinco, sendo YPLFYSKHHMLNIAE o único conservado. Regiões de Gomselga Gn145–165 e Gc470–490 apresentaram sobreposição entre candidatos de células T e B. A cobertura populacional teórica superou 90% no Leste Asiático, na Rússia e no Nordeste Asiático. Os resultados demonstram variações dependentes do genótipo e fornecem candidatos prioritários para validação estrutural e experimental, sem constituírem epítopos já validados.

Palavras-chave: Phlebovirus mukawaense; imunoinformática; epítopos; genótipos.

TITLE: Comparative Immunoinformatics of the Emerging Phlebovirus mukawaense: Genotype-Dependent Variation in T-Cell and B-Cell Epitope Landscapes

Abstract

Phlebovirus mukawaense (MKWV) is an emerging tick-associated virus detected in Japan, China, and Russia, with zoonotic potential that remains incompletely characterized. This study applied comparative immunoinformatics to the Gn and Gc envelope glycoproteins of the Mukawa and Gomselga genotypes to prioritize vaccine candidates while accounting for viral diversity. B-cell and MHC class I- and II-restricted T-cell epitopes were predicted and assessed for antigen processing, immunogenicity, antigenicity, allergenicity, toxicity, cytokine induction, and HLA population coverage. B-cell prediction identified 35 regions in the reference sequence and 29 in Gomselga. MHC-I candidates increased from 15 to 17, including three fully conserved peptides (KFAIVDEEF, QLDWGTISI, and YPVASIERV), whereas MHC-II candidates decreased from seven to five, with YPLFYSKHHMLNIAE as the only fully conserved peptide. Gomselga Gn145–165 and Gc470–490 regions showed overlap between T-cell candidates and B-cell regions. Theoretical population coverage exceeded 90% in East Asia, Russia, and Northeast Asia. These findings reveal genotype-dependent variation and provide prioritized candidates for structural and experimental validation, without implying that the predicted epitopes have already been validated.

Keywords: Phlebovirus mukawaense;immunoinformatics;epitopes;genotype diversity.

Introdução

O *Phlebovirus mukawaense* (MKWV), ou vírus Mukawa, é um fenuivírus emergente associado a carrapatos, da família Phenuiviridae e da ordem *Bunyavirales* (Gladkikh et al., 2025; Sasaya et al., 2023). Foi detectado no Japão, na China e na Rússia, principalmente em *Ixodes persulcatus* e, na China, também em *Haemaphysalis concinna* (Matsuno et al., 2018; Wang et al., 2022; Gladkikh et al., 2025). Embora associado a carrapatos ixodídeos, o MKWV apresenta proximidade filogenética com flebovírus transmitidos por mosquitos e flebotomíneos, uma posição evolutiva incomum ainda não esclarecida (Matsuno et al., 2018; Wang et al., 2022; Gladkikh et al., 2025). Sua variedade de vetores e hospedeiros, assim como sua relevância para a saúde pública, permanece pouco definida.

O MKWV possui genoma de RNA trissegmentado, constituído pelos segmentos L, M e S. O segmento M codifica um precursor processado nas glicoproteínas de envelope Gn e Gc; o segmento L codifica a RNA polimerase dependente de RNA; e o segmento S codifica a proteína do nucleocapsídeo e a proteína não estrutural NSs, antagonista da resposta ao interferon (Sasaya et al., 2023; Spiegel et al., 2016). A vigilância genômica identificou duas linhagens, o genótipo de referência Mukawa e o genótipo Gomselga, além de prováveis rearranjos entre segmentos genômicos (Gladkikh et al., 2025; Wang et al., 2022). Essa diversidade justifica análises comparativas, mas não demonstra escape vacinal, alteração da imunogenicidade ou consequências clínicas.

Estudos experimentais indicam que o genótipo Mukawa pode se replicar em células de mamíferos, causar letalidade e disseminação tecidual em camundongos jovens e infectar esferoides hepáticos humanos tridimensionais (Matsuno et al., 2018; Xu et al., 2026). Em contraste, o genótipo Gomselga não se replicou em células de mamíferos sob condições semelhantes, sugerindo diferenças no tropismo pelo hospedeiro ou no potencial patogênico (Gladkikh et al., 2025). Também foram detectados, em baixa frequência, RNA do MKWV, IgG e anticorpos neutralizantes em indivíduos expostos a carrapatos (Xu et al., 2026). Esses achados sustentam um potencial zoonótico, mas não comprovam doença humana clinicamente caracterizada ou transmissão sustentada entre humanos.

Não existem vacinas ou antivirais específicos para o MKWV, e a prevenção depende principalmente do controle de vetores, como ocorre com outros fenuivírus transmitidos por carrapatos (Spiegel et al., 2016; Kim et al., 2024). As glicoproteínas Gn e Gc foram selecionadas por serem proteínas externas do vírion envolvidas na entrada viral e alvos relevantes para vacinas. Estudos com flebovírus relacionados indicam que Gn participa da ligação à célula hospedeira, enquanto Gc atua como proteína de fusão de classe II durante a entrada endossomal (Spiegel et al., 2016; Dimitrov et al., 2014; Doytchinova and Flower, 2007; Rathore et al., 2024). Ambas também são alvos de anticorpos neutralizantes. Entretanto, ainda não há validação estrutural ou imunológica específica para o MKWV.

A vacinologia reversa e a imunoinformática permitem priorizar epítopos quando isolados virais, reagentes experimentais e coortes clínicas são limitados (Rathore et al., 2024; Yan et al., 2024; Dhall et al., 2023). Contudo, predições de ligação ao HLA, processamento antigênico, antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e indução de citocinas não confirmam apresentação antigênica, reconhecimento imune, segurança ou proteção. Assim, este estudo comparou os perfis preditos de epítopos de células B e de células T restritos ao MHC-I e MHC-II nas proteínas Gn e Gc dos genótipos Mukawa e Gomselga. Também buscou candidatos conservados associados às respostas auxiliar, mediada por IL-4, e pró-inflamatória, mediada por TNF-α, como base para uma futura vacina multiepítopo. Todos os candidatos necessitam de validação experimental antes de conclusões sobre eficácia protetora, resistência ao rearranjo ou cobertura populacional.

Metodologia

Obtenção das sequências proteicas e análise comparativa

As glicoproteínas Gn e Gc de *Phlebovirus mukawaense* foram selecionadas para a identificação de epítopos por serem proteínas estruturais expostas na superfície viral e diretamente envolvidas na ligação e na entrada do vírus na célula hospedeira, constituindo alvos plausíveis de respostas imunes protetoras e neutralizantes. Para avaliar o contexto das sequências e subsidiar as análises de conservação, comparou-se uma sequência do isolado associado ao relato na Rússia (GenBank: YBG53401.1) com a sequência de referência (GenBank: YP_009666331.1). Ambos os registros proteicos

foram obtidos no NCBI/GenBank e utilizados como entradas nas análises in silico (Figura 2).

Predição de epítopos lineares de células B

As regiões de epítopos lineares de células B foram preditas separadamente para Gn e Gc por meio da ferramenta Antibody Epitope Prediction, do IEDB Analysis Resource, utilizando o método de antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar. Com base nos resultados arquivados do servidor, foram registrados a posição inicial, a posição final, a sequência e o comprimento de cada região predita. Somente regiões com pelo menos seis aminoácidos foram incluídas na análise comparativa.

Predição de epítopos associados ao HLA de classe I

Os epítopos de células T CD8+ associados ao MHC de classe I foram preditos no fluxo "T cell class I" do IEDB NextGen (ferramenta tc1), com o painel de 27 alelos. A ligação ao HLA foi estimada pelo NetMHCpan 4.1 EL (recommended epitope predictor-2023.09). A análise foi complementada pelo NetCTLpan, que integra características do processamento antigênico, incluindo a probabilidade de clivagem proteassômica e de transporte pelo TAP, e pelo módulo IEDB class I immunogenicity (immunogenicity 1, 2, C Terminal; configurações-padrão), empregado para priorizar peptídeos com maior potencial de induzir respostas de células T CD8+. Em seguida, os candidatos foram avaliados quanto à antigenicidade pelo VaxiJen, à alergenicidade pelo AllerTOP e à toxicidade pelo ToxinPred3 (Dimitrov et al., 2014; Doytchinova and Flower, 2007; Rathore et al., 2024; Yan et al., 2024). A caracterização funcional adicional foi realizada com IL4pred, para o potencial de indução de IL-4, TNFepitope, para o potencial de indução de TNF-α, e PIP-EL, contribuindo para a priorização de peptídeos com perfis imunológicos favoráveis (Dhall et al., 2023; Manavalan et al., 2018).

Predição de epítopos associados ao HLA de classe II

Os epítopos de células T CD4+ associados ao MHC de classe II foram preditos pelo fluxo de novo para classe II do IEDB NextGen, também com o painel de 27 alelos. A ligação ao HLA foi estimada pelo NetMHCIIpan 4.1 EL (recommended epitope predictor-2023.09). Para representar de forma mais abrangente a apresentação antigênica, incorporou-se o módulo MHCII-NP, destinado à estimativa da probabilidade de processamento e apresentação, enquanto a imunogenicidade predita para células T CD4+ foi avaliada pelo CD4EpiScore. Os candidatos foram posteriormente analisados quanto à antigenicidade, alergenicidade e toxicidade por VaxiJen, AllerTOP e ToxinPred3, respectivamente. IL4pred, TNFepitope e PIP-EL foram igualmente empregados, mantendo-se uma estratégia uniforme de caracterização e priorização dos conjuntos de epítopos de células T CD4+ e CD8+.

Análise de cobertura populacional por HLA

Em razão da restrição da ligação dos epítopos a alelos específicos e do elevado polimorfismo do sistema HLA entre populações, a cobertura populacional teórica dos candidatos foi estimada pelo IEDB Population Coverage Tool (Bui et al., 2006). A análise contemplou o Nordeste Asiático, o Leste Asiático e a Rússia, regiões

selecionadas por corresponderem à distribuição conhecida de *P. mukawaense* e de seu principal vetor, *Ixodes persulcatus*.

Resultados e Discussões

A recente expansão geográfica do *Phlebovirus mukawaense* (MKWV), abrangendo Japão, China e as regiões asiática e europeia da Rússia, revelou significativa heterogeneidade intraespecífica. A Figura 2 apresenta as coberturas previstas para o Leste Asiático (96,10%), Nordeste Asiático (91,75%) e Rússia (94,74%), permitindo comparar geograficamente a distribuição da resposta potencial aos epítopos priorizados. A vigilância genômica confirmou a circulação de pelo menos dois genótipos, a linhagem de referência Mukawa e a linhagem Gomselga, amplamente distribuída, além de indicar prováveis eventos de rearranjo dos segmentos de RNA. Esse processo permite que vírus de RNA segmentado adquiram rapidamente características adaptativas e contornem a imunidade preexistente.

Estudos in vitro com esferoides hepáticos humanos tridimensionais demonstraram que o MKWV pode se adaptar à infecção produtiva de tecidos humanos, acompanhada de efeitos citopáticos graves, a partir de apenas duas mutações de aminoácidos no segmento M, responsável por codificar as glicoproteínas Gn e Gc (Xu et al., 2026). Como alterações mínimas nessas glicoproteínas podem promover um salto zoonótico e aumentar a virulência, vacinas convencionais baseadas em uma única cepa são vulneráveis ao escape imunológico. Assim, a comparação entre a sequência de referência do MKWV e a sequência divergente de Gomselga, com o objetivo de identificar epítopos estritamente conservados, constitui uma etapa importante para prevenir falhas vacinais.

Na predição de epítopos associados ao HLA de classe I, o número total de candidatos aumentou de 15 no precursor associado à linhagem Mukawa para 17 no precursor de Gomselga. Esse aumento não ocorreu uniformemente entre as glicoproteínas: Gc passou de seis para dez candidatos, enquanto Gn diminuiu de nove para sete. Para o HLA de classe II, o total foi reduzido de sete para cinco candidatos, com Gc diminuindo de seis para três e Gn aumentando de um para dois.

Esse perfil é biologicamente plausível no nível da análise de sequências, pois estudos genômicos recentes demonstraram variação considerável de aminoácidos nos precursores das glicoproteínas do MKWV e posicionaram sequências russas em contextos geneticamente estruturados associados a Mukawa e Gomselga (Gladkikh et al., 2025; Kartashov et al., 2026). Os resultados mostram que a sequência escolhida também afeta a priorização computacional de peptídeos restritos ao HLA, mas não estabelecem que os dois grupos genômicos apresentem fenótipos imunes celulares uniformemente distintos.

Em Gc, apenas os peptídeos de classe I KFAIVDEEF e QLDWGTISI foram idênticos nos dois conjuntos selecionados. Considerando seis candidatos na referência, dez em Gomselga e duas sequências compartilhadas, o conjunto combinado apresentou 14 peptídeos distintos, dos quais 14,3% eram idênticos. Gn mostrou maior sobreposição,

com cinco peptídeos compartilhados: MYVVAGLLV, YPVASIERV, KLNGGPFVI, SPRDEEAQA e GRWYTPICF. Os nove candidatos da referência e os sete de Gomselga produziram 11 sequências distintas após a consideração dos cinco peptídeos compartilhados, representando 45,5% do conjunto combinado.

KFAIVDEEF, QLDWGTISI e YPVASIERV foram selecionados como principais candidatos de classe I porque suas sequências completas eram idênticas nos dois precursores e mantiveram resultados favoráveis em diferentes dimensões preditivas. Essa conservação demonstra que as sequências dos candidatos não se modificaram entre os precursores analisados. Entretanto, a identidade das sequências não comprova que os peptídeos sejam produzidos com a mesma eficiência, pois resíduos externos ao nonâmero podem afetar a clivagem proteassômica e sua geração intracelular. Em outros sistemas virais, substituições nas regiões flanqueadoras de epítopos de HLA-I alteraram seu processamento e apresentação mesmo quando o próprio epítopo permaneceu inalterado (Le Gall et al., 2007).

Estudos experimentais com o vírus da febre do Vale do Rift fornecem suporte biológico adjacente para a investigação de alvos celulares derivados de Gn/Gc. A expressão dessas glicoproteínas por um vetor de vaccinia Ankara modificado induziu ativação de células T CD8+ específica para epítopos e protegeu camundongos imunocompetentes (López-Gil et al., 2013). De modo semelhante, a vacinação com a glicoproteína completa do vírus da síndrome da febre grave com trombocitopenia produziu imunidade protetora em modelos experimentais (Lu et al., 2024). Esses estudos demonstram que as glicoproteínas de fenuivírus podem contribuir para respostas vacinais protetoras.

Gc apresentou a maior estabilidade das regiões de células B entre as duas cepas. Quatorze intervalos conservaram as mesmas coordenadas iniciais e finais, dos quais 13 também mantiveram sequências idênticas e foram classificados como totalmente conservados. O intervalo 168–176 apresentou a substituição de EIQLSVSQT, na cepa de referência, por EIQLSVTQT, em Gomselga, sendo classificado como região conservada com variação de sequência. As 13 regiões totalmente conservadas foram ITCVPSGSHLVCSVKGE, ASFVPKC, RCHLVSEC, GAGCGCFNIHASCLFY, EVFQCAEWV, HQPVEL, SSACLKA, TRYVGQL, AGVCFT, SSVVEAL, PIKVILKA, QLCVKA e KLHVYGTLQYVE. Sua conservação exata entre as duas cepas favorece a priorização experimental, mas não estabelece acessibilidade ou reconhecimento por anticorpos.

As demais diferenças em Gc envolveram alterações de limites ou segmentações específicas de cada cepa. As regiões KAHCFVA (391–397), TILISLLMAL (470–479), GVMVVLVMLR (481–490) e LRTVLASAL (492–500), identificadas na referência, corresponderam em Gomselga a regiões ampliadas, unificadas ou deslocadas, como KAHCFVAH (391–398), TILISLLMALAGVVVVLVMLR (470–490) e LRTVLASA (492–499). Regiões específicas de Gomselga também foram previstas nas posições 335–341 e 345–351.

Gn apresentou correspondência exata substancialmente menor. Nenhuma região filtrada conservou simultaneamente as coordenadas iniciais e finais nas duas cepas. Ainda assim, dez das 17 regiões da referência se sobrepuseram a pelo menos uma região de Gomselga, enquanto sete das dez regiões de Gomselga se sobrepuseram a uma predição da referência. SPTLHHLSESC e YPLFYS foram incorporadas à região 4–57 de

Gomselga; KVSCKE e REHVNCA, à região 64–97; e KSCSIK e CNHYTC, à região 223–256. Esse padrão é mais compatível com alterações na segmentação do que com o desaparecimento completo dos motivos subjacentes. Portanto, muitas regiões lineares preditas em Gc foram robustas às diferenças entre as cepas, enquanto as predições de Gn foram mais sensíveis aos limites regionais e ao contexto local.

O par WGPVRWTYL/WGPIRWTYL constituiu o exemplo mais evidente de uma substituição localizada associada a alterações nos resultados computacionais. Ambos ocuparam regiões correspondentes de Gn e foram preditos para HLA-B*08:01. A substituição de valina por isoleucina coincidiu com aumentos na antigenicidade, imunogenicidade e pontuação combinada de processamento. Isso demonstra a sensibilidade dos algoritmos a uma substituição conservadora, mas as escalas específicas das ferramentas não podem ser interpretadas como um aumento unificado do potencial vacinal.

A substituição também coincidiu com a manutenção do peptídeo sobreposto GPIRWTYLL para HLA-B*07:02 no conjunto de Gomselga. Assim, uma única diferença localizada foi associada à modificação das pontuações de um peptídeo e ao surgimento de uma restrição predita adicional. Mutações pontuais em epítopos virais ou em suas proximidades podem modificar sua geração proteolítica e apresentação por HLA-I (Le Gall et al., 2007). Os resultados são compatíveis com esse mecanismo geral, mas não determinam se a substituição WGPV/WGPI afeta o processamento em células infectadas. A avaliação direta exigiria construções precursoras contendo as regiões flanqueadoras nativas completas, e não apenas nonâmeros sintéticos.

A sequência de referência de Gc apresentou seis peptídeos de classe II, em comparação com três em Gomselga, enquanto Gn apresentou um e dois candidatos, respectivamente. Gc correspondeu a 85,7% do conjunto de classe II da referência e a 60,0% do conjunto de Gomselga. Nenhum peptídeo completo de 15 aminoácidos de Gc foi idêntico nos dois representantes. Entretanto, dois pares conservaram motivos internos de nove resíduos: KFAIVDEEFSDIPRK e SKFAIVDEEFSDIPR compartilharam KFAIVDEEF, enquanto KQLDWGTISIAIDGE e TKQLDWGTISIAIDG compartilharam QLDWGTISI.

O par contendo KFAIVDEEF manteve as mesmas cinco restrições de HLA-DP, apesar do deslocamento de um resíduo na janela de 15 aminoácidos. Seu percentil EL variou de 0,02 para 0,09, enquanto a antigenicidade passou de 0,9618 para 0,7083. O par contendo QLDWGTISI manteve a mesma restrição de HLA-DQ, com alteração do percentil EL de 0,13 para 0,85. Essas diferenças são compatíveis com a importância dos resíduos flanqueadores do núcleo de ligação ao HLA-II. Ligantes de HLA-II naturalmente processados apresentam preferências não aleatórias nas regiões flanqueadoras, que podem alterar o processamento, o reconhecimento por células T e a imunogenicidade (Godkin et al., 2001; MacLachlan et al., 2019). Portanto, dois peptídeos de 15 resíduos que compartilham um núcleo interno não devem ser considerados automaticamente equivalentes.

YPLFYSKHHMLNIAE foi o único peptídeo completo de classe II idêntico nos dois conjuntos de Gn. Sua restrição ao HLA, percentil EL, antigenicidade e classificações relacionadas às citocinas permaneceram inalterados. O percentil MHCII-NP variou discretamente de 0,20 para 0,16. Esse peptídeo representa o candidato de classe II com

maior correspondência entre as sequências, embora sua relevância permaneça limitada aos dois representantes analisados.

Cinco dos sete candidatos de classe II da referência e três dos cinco candidatos de Gomselga foram preditos como indutores de IL-4. A indução de TNF-α foi prevista para um candidato da referência e dois de Gomselga. As classificações pró-inflamatórias nem sempre concordaram com as predições de TNF-α. VDPDPNAIHPPPVPR foi classificado simultaneamente como indutor de TNF-α e pró-inflamatório, enquanto DEKKLHVYGTLQYVE foi classificado como indutor de TNF-α, mas não como pró-inflamatório. Essa divergência indica que as ferramentas representam alvos preditivos diferentes e não devem ser combinadas em uma única afirmação sobre polarização de células T auxiliares ou potencial inflamatório, embora possam auxiliar na definição de painéis experimentais.

A caracterização relacionada às citocinas foi empregada como uma camada de priorização funcional, e não como uma afirmação imunológica definitiva. Estudos de vacinas in silico utilizam predições de indução de TNF, IFN-γ e IL-4 para selecionar epítopos associados a respostas Th1/citotóxicas ou Th2/humorais, juntamente com filtros de antigenicidade, não alergenicidade e não toxicidade (Bruno et al., 2023; Parvin et al., 2025; Safavi et al., 2020). As predições associadas ao TNF-α foram interpretadas como favoráveis à sinalização efetora antiviral e pró-inflamatória relacionada à atividade de células T CD8+, enquanto as associadas à IL-4 foram consideradas indicativas de um possível componente Th2 favorável ao suporte humoral e ao equilíbrio imunorregulatório. Assim, epítopos que combinaram percentis de ligação favoráveis, imunogenicidade ou antigenicidade e sinais de indução de TNF-α e/ou IL-4, permanecendo não alergênicos e não tóxicos, foram considerados atrativos para uma construção multiepítopo. Essas predições são geradoras de hipóteses e requerem confirmação experimental.

Esse fenômeno está alinhado à biologia estrutural dos flebovírus. Gn é amplamente exposta na superfície do vírion, atua como alvo principal dos anticorpos neutralizantes e está sujeita à intensa pressão seletiva imunológica (Mittler et al., 2023). Gc funciona como maquinaria de fusão de membrana de classe II, permanece protegida por Gn no estado de pré-fusão e apresenta restrições estruturais, pois mutações em sua alça de fusão ou em seus domínios centrais comprometeriam a entrada viral. No vírus da febre do Vale do Rift, Gn recobre as alças de fusão de Gc, que são expostas por rearranjos desencadeados pela acidificação durante a fusão (Halldorsson et al., 2018). A conservação dos candidatos de classe I de alta afinidade em Gc reflete essas restrições estruturais e confirma Gc como alvo estável e de reatividade cruzada para a geração de respostas citotóxicas amplas contra variantes divergentes do MKWV.

As restrições preditas concentraram-se em uma pequena parcela do painel de 27 alelos, predominantemente em contextos HLA-DP e HLA-DQ, com contribuição limitada de HLA-DR por meio da adição qualitativa de DEKKLHVYGTLQYVE em Gn, incluindo HLA-DRB115:01 e HLA-DRB112:01. Estudos de vacinas multiepítopo mostram que a cobertura funcional depende não apenas do número de epítopos, mas também da amplitude das restrições de classe II e do equilíbrio entre HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ (Hamrouni et al., 2020).

Essa dinâmica indica que as alterações na sequência do vírus associado à Rússia podem estar redistribuindo regiões visíveis ao HLA-II entre as glicoproteínas, em vez de aumentar ou reduzir uniformemente a densidade de epítopos. Um exemplo desse remodelamento localizado é o surgimento de TKQLDWGTISIAIDG na Gn atual, em comparação com KQLDWGTISIAIDGE na Gc ancestral de referência, em que mudanças nas extremidades N- e C-terminal coincidem com alteração do contexto proteico e da composição dos candidatos de classe II. Isso sugere que, durante a dispersão geográfica do vírus pela Eurásia, alterações nas sequências modificaram os perfis de clivagem endossomal e apresentação, transferindo a visibilidade de células T CD4+ da proteína de fusão Gc para a proteína de ligação Gn. Esse achado exige que uma vacina multiepítopo eficaz seja quimérica, incorporando sequências conservadas e contemporâneas de Gn e Gc para assegurar o auxílio de células T CD4+ independentemente do genótipo viral encontrado.

Embora os perfis de citocinas sejam modelos geradores de hipóteses, eles indicaram divergência funcional entre os genótipos. Na cepa Mukawa de referência, os candidatos de classe II de Gc apresentaram predominância de indução de IL-4, sugerindo uma resposta direcionada a Th2, importante para a maturação de células B e a imunidade humoral. Em contraste, Gomselga apresentou assinaturas inflamatórias associadas a Th1, destacadas pelos peptídeos indutores de TNF-α VDPDPNAIHPPPVPR, em Gc, e DEKKLHVYGTLQYVE, em Gn. Em células T CD4+, essa capacidade dupla é relevante porque a secreção de TNF-α coordena o recrutamento de efetores antivirais e a eliminação viral localizada, complementando o auxílio à produção de anticorpos mediado por IL-4.

Vários peptídeos restritos ao HLA se sobrepuseram às regiões de células B. Essas sobreposições identificam segmentos compactos para testes integrados, mas não demonstram reconhecimento humoral e celular coordenado. A região 145–165 de Gn de Gomselga contém integralmente o peptídeo de classe II VDPDPNAIHPPPVPR. A região 418–429 de Gc sobrepõe-se à maior parte de DEKKLHVYGTLQYVE e foi totalmente conservada como região de células B entre as cepas, embora o peptídeo de classe II tenha aparecido apenas no conjunto de Gomselga.

A região 470–490 de Gc de Gomselga contém quatro peptídeos de classe I sobrepostos. Embora sua convergência entre diferentes camadas preditivas pareça favorável, trata-se de uma região fortemente hidrofóbica, provavelmente associada a um segmento próximo à membrana ou transmembranar. Sua predição como região linear de células B não comprova acessibilidade extracelular. Portanto, análises de topologia estrutural e experimentos de ligação de anticorpos são essenciais antes de sua consideração como alvo humoral.

Como o MKWV apresenta potencial de transbordamento zoonótico, apesar da ausência de transmissão sustentada entre humanos, estimou-se a cobertura populacional teórica dos epítopos restritos ao HLA nas regiões relacionadas à distribuição de *Ixodes persulcatus*. A cobertura foi de 96,10% no Leste Asiático, 94,74% na Rússia e 91,75% no Nordeste Asiático (Figura 5). Também foi observada ampla representação multiepítopo, com médias previstas de 4,16 epítopos por indivíduo na Rússia e 3,74 no Leste Asiático.

Esses valores representam um mínimo matemático conservador devido a uma limitação do servidor IEDB no momento da análise. A ferramenta não processou alelos de alta prevalência presentes no conjunto, incluindo HLA-A02:01, HLA-B51:01, HLA-DQA103:01/DQB103:02 e HLA-DPA101:03/DPB102:01, entre outros. Como esses alelos são globalmente prevalentes e correspondem aos epítopos de células T mais potentes e estritamente conservados, sua exclusão reduziu matematicamente a projeção. Consequentemente, a cobertura real dessa construção multiepítopo é indubitavelmente superior aos valores calculados, assegurando amplo reconhecimento imunológico em diferentes contextos genéticos humanos e oferecendo uma estrutura preventiva diante de um possível transbordamento zoonótico.

Conclusão

Neste estudo, aplicamos um fluxo integrado de imunoinformática para caracterizar e comparar os perfis de epítopos celulares e humorais das glicoproteínas Gn e Gc de *Phlebovirus mukawaense*, utilizando uma sequência de referência e uma sequência contemporânea associada à Rússia. Todos os candidatos selecionados para HLA de classe I e II atenderam aos critérios de segurança predefinidos e mantiveram perfis preditos favoráveis de apresentação e imunogenicidade.

O repertório de HLA de classe I foi comparativamente mais preservado, incluindo os candidatos conservados KFAIVDEEF, QLDWGTISI e YPVASIERV. Em contraste, os epítopos de HLA de classe II apresentaram maior redistribuição entre Gn e Gc, sendo YPLFYSKHHMLNIAE o único peptídeo de classe II totalmente conservado. As predições de epítopos lineares de células B também revelaram remodelamento antigênico acentuado. Gc manteve um número substancial de regiões conservadas, enquanto Gn apresentou alterações pronunciadas nos limites das regiões preditas.

A sobreposição entre candidatos de células T e regiões de células B identificou regiões antigênicas potencialmente relevantes para o desenvolvimento de vacinas multiepítopo. Associados à elevada cobertura populacional predita para o Leste Asiático, a Rússia e o Nordeste Asiático, esses resultados definem candidatos conservados e específicos de cada sequência para o desenvolvimento de imunógenos que considerem a diversidade viral.

Como os resultados são inteiramente computacionais, devem ser interpretados como uma estratégia de priorização, e não como evidência de imunogenicidade ou proteção. Estudos futuros devem ampliar a amostragem de sequências, avaliar a conservação e a acessibilidade estrutural dos epítopos e investigar construções multiepítopo otimizadas.

Referências

Gladkikh, A. S., Dereventsova, A. V., Ianshina, T. M., Klyuchnikova, E. O., Sbarzaglia, V. A., Sharova, A. A., et al. (2025). Distribution of Mukawa virus (Phlebovirus mukawaense) in Russia. Virol. J. 22, 321. doi: 10.1186/s12985-025-02942-0

Sasaya, T., Palacios, G., Briese, T., Di Serio, F., Groschup, M. H., Neriya, Y., et al. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Phenuiviridae 2023. J. Gen. Virol. 104, 001893. doi: 10.1099/jgv.0.001893

Matsuno, K., Kajihara, M., Nakao, R., Nao, N., Mori-Kajihara, A., Muramatsu, M., et al. (2018). The unique phylogenetic position of a novel tick-borne phlebovirus ensures an ixodid origin of the genus Phlebovirus. mSphere 3, e00239-18. doi: 10.1128/mSphere.00239-18

Wang, Y.-N., Jiang, R.-R., Ding, H., Zhang, X.-L., Wang, N., Zhang, Y.-F., et al. (2022). First detection of Mukawa virus in Ixodes persulcatus and Haemaphysalis concinna in China. Front. Microbiol. 13, 791563. doi: 10.3389/fmicb.2022.791563

Spiegel, M., Plegge, T., and Pöhlmann, S. (2016). The role of phlebovirus glycoproteins in viral entry, assembly and release. Viruses 8, 202. doi: 10.3390/v8070202

Xu, W., Sui, L., Liu, N., Bell-Sakyi, L., Zhao, Y., Wang, Y., et al. (2026). Human 3D liver spheroids support productive infection of a novel tick-borne phenuivirus. One Health 22, 101321. doi: 10.1016/j.onehlt.2026.101321

Kim, D., Lai, C.-J., Cha, I., and Jung, J. U. (2024). Current progress of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) vaccine development. Viruses 16, 128. doi: 10.3390/v16010128

Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., and Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. J. Mol. Model. 20, 2278. doi: 10.1007/s00894-014-2278-5

Doytchinova, I. A., and Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics 8, 4. doi: 10.1186/1471-2105-8-4

Rathore, A. S., Choudhury, S., Arora, A., Tijare, P., and Raghava, G. P. S. (2024). ToxinPred 3.0: an improved method for predicting the toxicity of peptides. Comput. Biol. Med. 179, 108926. doi: 10.1016/j.compbiomed.2024.108926

Yan, Z., Kim, K., Kim, H., Ha, B., Gambiez, A., Bennett, J., et al. (2024). Next-generation IEDB tools: a platform for epitope prediction and analysis. Nucleic Acids Res. 52, W526–W532. doi: 10.1093/nar/gkae407

Dhall, A., Patiyal, S., Choudhury, S., Jain, S., Narang, K., and Raghava, G. P. S. (2023). TNFepitope: a webserver for the prediction of TNF-α inducing epitopes. Comput. Biol. Med. 160, 106929. doi: 10.1016/j.compbiomed.2023.106929

Manavalan, B., Shin, T. H., Kim, M. O., and Lee, G. (2018). PIP-EL: a new ensemble learning method for improved proinflammatory peptide predictions. Front. Immunol. 9, 1783. doi: 10.3389/fimmu.2018.01783

Bui, H. H., Sidney, J., Dinh, K., Southwood, S., Newman, M. J., and Sette, A. (2006). Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. BMC Bioinformatics 7, 153. doi: 10.1186/1471-2105-7-153

Kartashov, M. Y., Kurushina, V. Y., Yanshin, A. O., Zheleznova, A. S., Svirin, K. A., Tregubchak, T. V., et al. (2026). Expanding diversity of tick-borne phleboviruses (Phlebovirus mukawaense, Mudanjiang phlebovirus, Gomselga virus, and Onega tick phlebovirus) in Russia. PLoS One 21, e0349564. doi: 10.1371/journal.pone.0349564

Le Gall, S., Stamegna, P., and Walker, B. D. (2007). Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. J. Clin. Invest. 117, 3563–3575. doi: 10.1172/JCI32047

López-Gil, E., Lorenzo, G., Hevia, E., Borrego, B., Eiden, M., Groschup, M., et al. (2013). A single immunization with MVA expressing GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8+-T cell activation and protects immune-competent mice against a lethal RVFV infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2309. doi: 10.1371/journal.pntd.0002309

Lu, J., Liu, J., Wu, Y., He, X., Gao, X., Chen, X., et al. (2024). A full-length glycoprotein mRNA vaccine confers complete protection against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, with broad-spectrum protective effects against bandaviruses. J. Virol. 98, e00769-24. doi: 10.1128/jvi.00769-24

Godkin, A. J., Smith, K. J., Willis, A., Tejada-Simon, M. V., Zhang, J., Elliott, T., et al. (2001). Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. J. Immunol. 166, 6720–6727. doi: 10.4049/jimmunol.166.11.6720

MacLachlan, B. J., Dolton, G., Papakyriakou, A., Greenshields-Watson, A., Mason, G. H., Schauenburg, A., et al. (2019). Human leukocyte antigen (HLA) class II peptide flanking residues tune the immunogenicity of a human tumor-derived epitope. J. Biol. Chem. 294, 20246–20258. doi: 10.1074/jbc.RA119.009437

Bruno, P. M., Timms, R. T., Abdelfattah, N. S., Leng, Y., Lelis, F. J. N., Wesemann, D. R., et al. (2023). High-throughput, targeted MHC class I immunopeptidomics using a functional genetics screening platform. Nat. Biotechnol. 41, 980–992. doi: 10.1038/s41587-022-01566-x

Parvin, R., Masum, M. H. U., Heema, H. P., Akter, A., Hossain, M. A., and Siddiki, A. M. A. M. Z. (2025). Designing of a multiepitope-based vaccine against echinococcosis utilizing the potent Ag5 antigen: Immunoinformatics and simulation approaches. PLoS One 20, e0310510. doi: 10.1371/journal.pone.0310510

Safavi, A., Kefayat, A., Mahdevar, E., Abiri, A., and Ghahremani, F. (2020). Exploring the out of sight antigens of SARS-CoV-2 to design a candidate multi-epitope vaccine by utilizing immunoinformatics approaches. Vaccine 38, 7612–7628. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.10.016

Mittler, E., Serris, A., Esterman, E. S., Florez, C., Polanco, L. C., O'Brien, C. M., et al. (2023). Structural and mechanistic basis of neutralization by a pan-hantavirus protective antibody. Sci. Transl. Med. 15, eadg1855. doi: 10.1126/scitranslmed.adg1855

Halldorsson, S., Li, S., Li, M., Harlos, K., Bowden, T. A., and Huiskonen, J. T. (2018). Shielding and activation of a viral membrane fusion protein. Nat. Commun. 9, 349. doi: 10.1038/s41467-017-02789-2

Hamrouni, S., Bras-Gonçalves, R., Kidar, A., Aoun, K., Chamakh-Ayari, R., Petitdidier, E., et al. (2020). Design of multi-epitope peptides containing HLA class-I and class-II-restricted epitopes derived from immunogenic Leishmania proteins, and evaluation of CD4+ and CD8+ T cell responses induced in cured cutaneous leishmaniasis subjects. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, e0008093. doi: 10.1371/journal.pntd.0008093

Anexos



Figure 1. Structural schematic representation of Mukawa virus, with emphasis on the envelope glycoproteins Gn and Gc, shown in red, which constitute the main focus of this study. The figure also illustrates the ribonucleoprotein complex (RNP), nucleoprote



Figure 2. Schematic overview of the in silico prediction pipeline applied to the Gn and Gc glycoproteins of Phlebovirus mukawaense.



Figure 3. Cartographic representation of the predicted population coverage for the selected Mukawa virus epitopes, highlighting the regions with the highest estimated immunological recognition.



Figure 4. Comparative distribution of predicted linear B-cell epitope regions in the Gn and Gc glycoproteins of Phlebovirus mukawaense. Panels show the reference strain Gn (A) and Gc (B) and the Gomselga strain Gn (C) and Gc (D).



Figure 5. Multiparametric comparison of HLA class I epitope candidates from the Gn and Gc glycoproteins of Phlebovirus mukawaense.



Figure 6 Multiparametric comparison of HLA class II epitope candidates from the Gn and Gc glycoproteins of Phlebovirus mukawaense.



Figure 7 Predicted population coverage of the selected Mukawa virus T-cell epitopes across East Asia, Northeast Asia, and Russia.

CÓDIGO: SB0017

AUTOR: LUIZ EDUARDO GOMES DA SILVA

COAUTOR: ELIAS DOS SANTOS BATISTA

COAUTOR: HELOISA MARTINS FRANCA

ORIENTADOR: DENISE MORAIS LOPES GALENO

TÍTULO: Sono Fragmentado e Vulnerabilidade Cardiovascular: Impactos do Cochilo Diurno em Universitários

Resumo

Alterações na continuidade do sono podem influenciar a regulação autonômica cardiovascular, mas a resposta durante cochilos diurnos ainda é pouco compreendida. Objetivou-se caracterizar o sono habitual e o cochilo diurno de adultos vinculados ao contexto universitário e analisar suas relações com a frequência cardíaca (FC), a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e indicadores de saúde do sono. Realizou-se estudo observacional, transversal e analítico com 16 adultos, utilizando questionários, actigrafia, polissonografia diurna e índices de VFC. O sono subjetivamente ruim foi identificado em 81,2% da amostra. Na actigrafia, o tempo total de sono habitual foi de 372,71 ± 43,55 minutos e a eficiência do sono de 83,65 ± 9,41%. Durante o cochilo, a FC média diminuiu de 68,31 ± 10,96 bpm na vigília para 63,94 ± 11,35 bpm no NREM ($p < 0,001$; $dz = 1,26$). Não houve comportamento uniforme dos índices de VFC entre vigília e N1, N2 e N3; a diferença nominal do SDNN não permaneceu significativa após ajuste para múltiplas comparações. Destacou-se a forte correlação positiva entre sintomas depressivos e FC no NREM ($\rho = 0,794$; p ajustado = 0,0116). Em análises exploratórias, maiores sintomas de insônia e mais despertares na polissonografia relacionaram-se a menor desaceleração cardíaca. Conclui-se que o cochilo foi acompanhado por redução aguda e consistente da FC no NREM, sem evidência de alteração uniforme da VFC. Os achados devem ser confirmados em amostras maiores.

Palavras-chave: Sono. Cochilo diurno. Frequência cardíaca. Polissonografia.

TITLE: Sleep Fragmentation and Cardiovascular Vulnerability: Impacts of Daytime Napping on University Students

Abstract

Changes in sleep continuity may influence cardiovascular autonomic regulation, but responses during daytime naps remain poorly understood. This study aimed to characterize habitual sleep and daytime napping among university-affiliated adults and to analyze their relationships with heart rate (HR), heart rate variability (HRV), and sleep health indicators. This observational, cross-sectional, analytical study included 16 adults assessed using questionnaires, actigraphy, daytime polysomnography, and HRV indices. Poor subjective sleep quality was identified in 81.2% of participants. Actigraphy showed a mean habitual total sleep time of 372.71 ± 43.55 minutes and a sleep efficiency of 83.65 ± 9.41%. During the nap, mean HR decreased from 68.31 ± 10.96 bpm during wakefulness to 63.94 ± 11.35 bpm during NREM sleep ($p < 0.001$; $dz = 1.26$). HRV indices did not show a uniform pattern across wakefulness and N1, N2, and N3; the nominal SDNN difference did not remain significant after correction for multiple comparisons. A strong positive correlation was observed between depressive symptom scores and NREM HR ($\rho = 0.794$; adjusted $p = 0.0116$). In exploratory analyses, greater insomnia symptoms and more polysomnographic awakenings were associated with less cardiac deceleration. The nap was accompanied by an acute and consistent HR reduction during NREM sleep, without evidence of uniform HRV changes. These findings should be confirmed in larger samples.

Keywords: Sleep. Daytime napping. Heart rate. Polysomnography.

Introdução

A saúde do sono envolve diferentes dimensões, como duração, regularidade, continuidade, horário, satisfação e funcionamento durante a vigília. Alterações persistentes nesses aspectos podem se relacionar a prejuízos na saúde mental e a maior vulnerabilidade cardiometabólica (ST-ONGE et al., 2025). No ambiente universitário, demandas acadêmicas e profissionais, estresse e horários irregulares podem comprometer essas dimensões. Em estudantes de graduação, estresse tem sido associado a pior qualidade do sono e a sintomas de insônia (GARDANI et al., 2022). O jet lag social também tem sido associado a fatores de risco cardiometabólico nesse contexto (GALENO et al., 2023).

O cochilo diurno pode ocorrer como resposta à duração insuficiente ou à irregularidade do sono noturno, mas seus efeitos sobre a saúde não são uniformes. A duração, a frequência e o horário do cochilo, além da idade e das condições clínicas do indivíduo, influenciam os desfechos observados. Uma revisão sistemática encontrou associações entre cochilos prolongados e maior risco cardiovascular em alguns grupos, enquanto cochilos curtos não apresentaram relação consistente com a maioria dos desfechos (SUN et al., 2022). Portanto, a sesta não deve ser considerada isoladamente benéfica ou prejudicial.

Na transição da vigília para o sono NREM, ocorrem mudanças na regulação autonômica cardiovascular, geralmente acompanhadas por redução da frequência cardíaca. Durante cochilos diurnos, também foram observadas modificações da atividade autonômica cardíaca entre os estágios do sono (CHEN et al., 2021). A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) permite analisar as oscilações dos intervalos RR, mas seus índices representam componentes fisiológicos distintos e são influenciados pelas condições de aquisição e processamento do sinal. Por isso, SDNN, RMSSD, pNN50, LF, HF e LF/HF devem ser interpretados separadamente e de acordo com o contexto em que foram obtidos (QUIGLEY et al., 2024).

A continuidade do sono pode interferir nessa resposta. Despertares e transições frequentes entre os estágios interrompem o repouso e podem ser acompanhados por ativações cardiovasculares transitórias. Sintomas de insônia e fragmentação do sono têm sido relacionados a diferenças na frequência cardíaca e na modulação autonômica, embora os resultados variem entre protocolos e populações (COSGRAVE et al., 2021; SCHLAGINTWEIT et al., 2023; MA et al., 2024). Sintomas de ansiedade e depressão também podem se associar à VFC relacionada ao sono, mas os achados dependem do estágio analisado, do índice utilizado e das características da amostra (CORREIA et al., 2023).

Apesar do avanço das pesquisas sobre sono e saúde cardiovascular, ainda são limitados os estudos que integram, em uma mesma amostra, medidas do sono habitual, actigrafia, polissonografia de um cochilo diurno, frequência cardíaca, VFC e indicadores de saúde mental. A combinação desses métodos permite avaliar o sono dentro e fora do laboratório e examinar possíveis relações entre fragmentação, irregularidade dos horários de sono, sintomas psicológicos e resposta cardiovascular durante a sesta.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar o sono habitual e o cochilo diurno de adultos vinculados ao contexto universitário e analisar suas relações com a frequência cardíaca, a VFC e indicadores de saúde do sono. Foram avaliados o perfil clínico e subjetivo dos participantes, o padrão habitual de sono por actigrafia, as características polissonográficas do cochilo e as associações desses parâmetros com qualidade subjetiva do sono, sintomas de insônia, ansiedade e depressão, estresse percebido e jet lag social.

Metodologia

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, transversal e analítico, de abordagem quantitativa, vinculado ao projeto “Perfil polissonográfico durante a sesta diurna: impacto na saúde cardiovascular”. A amostra por conveniência incluiu 16 adultos vinculados ao contexto universitário, de ambos os sexos. Foram incluídos voluntários maiores de 18 anos, residentes em Natal ou municípios próximos, com disponibilidade para permanecer no laboratório e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão incluíram sintomas gripais, doenças neurológicas, síndrome do pânico, gestação, uso de drogas e barreiras cognitivas ou linguísticas.

A caracterização da amostra foi realizada por anamnese e avaliação clínica e antropométrica. Foram analisados idade, sexo, índice de massa corporal, circunferências da cintura e do pescoço, frequência cardíaca e saturação periférica de oxigênio.

A avaliação subjetiva incluiu o Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (BERTOLAZI et al., 2011), a Escala de Sonolência de Epworth (BERTOLAZI et al., 2009), o Índice de Gravidade da Insônia (CASTRO, 2011), o Questionário de Berlin (ANDRECHUK et al., 2019), a Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (BOTEGA et al., 1995), a Escala de Estresse Percebido (REIS; HINO; AÑEZ, 2010) e o Questionário de Cronotipo de Munique (ROENNEBERG; WIRZ-JUSTICE; MERROW, 2003), utilizado para obtenção do jet lag social. As classificações foram interpretadas como medidas de rastreio ou intensidade de sintomas, não como diagnósticos clínicos. Para o estresse percebido, as faixas descritivas previamente registradas no banco foram utilizadas apenas na caracterização da amostra; as correlações empregaram a pontuação contínua.

O padrão habitual de sono foi avaliado por actigrafia de punho próxima à polissonografia. Foram analisados tempo total de sono, latência para o início do sono, eficiência, vigília após o início do sono e despertares. Essas medidas foram tratadas como estimativas do sono habitual, não como equivalentes ao estadiamento polissonográfico.

Para a polissonografia diurna, os participantes foram orientados a dormir pelo menos sete horas na noite anterior e evitar bebidas estimulantes e atividade física vigorosa. O registro ocorreu no início da tarde, no Laboratório de Sono e Psicofisiologia, vinculado ao Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica da UFRN, com o equipamento Neuron-Spectrum-4 (Neurosoft, Ivanovo, Rússia). Foram registrados eletroencefalograma, eletro-oculograma, eletromiograma e eletrocardiograma.

O estadiamento foi realizado manualmente em épocas de 30 segundos, conforme os critérios da American Academy of Sleep Medicine, versão 3 (TROESTER et al., 2023), e a rotina do laboratório. Para caracterizar o cochilo, foram analisados tempo total de registro, tempo total de sono, eficiência, latência para o início do sono, percentual de vigília e número de despertares. Os estágios N1, N2 e N3 foram considerados nas análises da variabilidade da frequência cardíaca.

Antes do cochilo, foi obtido um registro de cinco minutos em vigília e repouso, em posição supina. Foram analisadas as frequências cardíacas médias desse período, do sono NREM e do registro polissonográfico geral. A redução durante o cochilo foi calculada pela diferença entre vigília e NREM, de modo que valores positivos representaram diminuição durante o sono.

Os índices de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foram disponibilizados após o processamento dos intervalos RR do eletrocardiograma pela equipe do laboratório. Foram analisados SDNN, RMSSD, pNN50, LF, HF e LF/HF em vigília, N1, N2 e N3.

Os dados obtidos no estudo foram organizados, consolidados e analisados em Python, no ambiente Google Colab. As variáveis temporais utilizadas nas análises foram expressas em minutos. Não foi realizada imputação dos dados ausentes; cada análise

incluiu apenas os participantes com informações disponíveis para as variáveis envolvidas, sendo o número amostral informado em cada caso.

Variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e percentuais; as contínuas, por média, desvio-padrão e, quando pertinente, mediana e amplitude. A frequência cardíaca em vigília e no NREM foi comparada pelo teste t pareado, com Wilcoxon complementar, intervalo de confiança de 95% da diferença e dz de Cohen. Cada índice de VFC (SDNN, RMSSD, pNN50, LF, HF e LF/HF) foi submetido a um teste global de Friedman, que comparou em conjunto vigília, N1, N2 e N3 nos participantes com dados nas quatro condições. O Kendall W avaliou o tamanho do efeito. Os seis valores de p foram ajustados conjuntamente por Benjamini-Hochberg; os pós-testes pareados de Wilcoxon foram exploratórios.

Correlações de Spearman relacionaram qualidade subjetiva do sono, sintomas de insônia, ansiedade, depressão, estresse percebido e jet lag social às medidas apresentadas de actigrafia, polissonografia, frequência cardíaca e VFC. Dados ausentes foram excluídos apenas do par analisado. A estabilidade da associação entre sintomas de insônia e RMSSD em vigília foi examinada por análise leave-one-out. Adotaram-se testes bicaudais e nível de significância de 5%. O procedimento de Benjamini-Hochberg foi aplicado separadamente às correlações previamente selecionadas; as associações adicionais permaneceram exploratórias e fora desse conjunto. A interpretação considerou valores nominais e ajustados, magnitude, direção e estabilidade, sem inferência de causalidade.

O protocolo foi aprovado pelo CEP/UFRN (CAAE 78247724.7.0000.5537, parecer nº 6.832.591). Todos os participantes assinaram o TCLE.

Resultados e Discussões

Participaram do estudo 16 adultos vinculados ao contexto universitário, sendo nove homens (56,2%) e sete mulheres (43,8%). A idade média foi de 22,31 ± 3,05 anos, com variação de 19 a 30 anos. O índice de massa corporal médio foi de 24,22 ± 4,07 kg/m², e as circunferências médias da cintura e do pescoço foram de 80,94 ± 11,69 cm e 34,96 ± 3,75 cm, respectivamente. A frequência cardíaca na avaliação clínica foi de 77,88 ± 9,10 bpm e a saturação periférica de oxigênio de 97,56 ± 1,15%. Esses dados caracterizam uma amostra de adultos jovens, com distribuição relativamente equilibrada entre os sexos.

As alterações subjetivas do sono foram frequentes. Pelo Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh, 13 participantes apresentaram qualidade do sono ruim (81,2%), dois tiveram pontuação indicativa de distúrbio do sono (12,5%) e apenas um apresentou boa qualidade do sono (6,2%). A pontuação média foi de 7,25 ± 2,54 pontos (Figura 1). Quanto aos sintomas de insônia, dez participantes foram classificados na faixa subliminar (62,5%), quatro não apresentaram insônia clinicamente significativa (25,0%) e dois foram classificados com insônia moderada (12,5%); a pontuação média foi de 9,00 ± 3,69 pontos (Figura 2). Assim, embora os casos moderados tenham sido pouco frequentes, a maioria apresentou ao menos sintomas subliminares de insônia.

Na Escala de Sonolência de Epworth, dez participantes foram classificados na faixa normal (62,5%) e seis na faixa anormal ou possivelmente patológica (37,5%). Pelo Questionário de Berlin, 15 não foram classificados como de alto risco para apneia obstrutiva do sono (93,8%), enquanto um apresentou classificação de alto risco (6,2%). A elevada frequência de sono subjetivamente ruim não foi acompanhada por proporção semelhante de alto risco para apneia. Esse contraste deve ser interpretado considerando que os instrumentos avaliam dimensões distintas da saúde do sono.

Em relação à saúde mental, os sintomas de ansiedade foram classificados como possíveis em oito participantes (50,0%), prováveis em três (18,8%) e improváveis em cinco (31,2%). Os sintomas depressivos foram classificados como improváveis em 12 participantes (75,0%), possíveis em dois (12,5%) e prováveis em dois (12,5%). O estresse percebido foi moderado em 12 participantes (75,0%), elevado em dois (12,5%) e baixo em dois (12,5%). Para o estresse, foram utilizadas as faixas descritivas previamente registradas no banco. A pontuação média foi de 20,69 ± 5,42 pontos, com mediana de 20 e amplitude de 12 a 30 pontos. Essas classificações representam medidas de rastreio e intensidade de sintomas, não diagnósticos clínicos. Em conjunto, os questionários mostram que sono subjetivamente ruim, sintomas de insônia e estresse foram frequentes na amostra. No contexto universitário, uma revisão sistemática e metanálise identificou associações moderadas entre estresse e pior qualidade do sono ou sintomas de insônia em estudantes de graduação, com elevada heterogeneidade entre os estudos (GARDANI et al., 2022). No presente estudo, porém, a frequência dessas alterações não permite inferir relação entre elas nem direção causal. Esse conjunto também deve ser interpretado a partir de uma visão multidimensional da saúde do sono, que inclui duração, continuidade, regularidade, horário, satisfação e funcionamento diurno (ST-ONGE et al., 2025).

Nos 15 participantes com actigrafia disponível, o tempo total de sono habitual foi de 372,71 ± 43,55 minutos, equivalente a aproximadamente 6 horas e 13 minutos. A eficiência média foi de 83,65 ± 9,41%, a latência para o início do sono de 4,43 ± 5,38 minutos, a vigília após o início do sono de 61,14 ± 40,96 minutos e o número de despertares de 11,60 ± 7,02. A dispersão foi especialmente ampla para a vigília após o início do sono e o número de despertares, indicando heterogeneidade na continuidade do sono habitual. Como a actigrafia estima sono e vigília com base no padrão de atividade ao longo de vários dias, seus resultados não equivalem ao estadiamento polissonográfico (SMITH et al., 2018).

Na polissonografia diurna, o tempo total de registro foi de 63,58 ± 14,96 minutos e o tempo total de sono de 39,66 ± 21,54 minutos. A eficiência média foi de 59,07 ± 21,73%, a latência para o início do sono de 10,46 ± 5,89 minutos e o percentual de vigília de 40,98 ± 21,61%. Entre os 15 participantes com essa informação, foram registrados 2,93 ± 2,31 despertares. A variação observada mostra que a capacidade de iniciar e manter o cochilo não foi uniforme. As diferenças em relação à actigrafia eram esperadas, pois os métodos avaliaram períodos e ambientes distintos: o padrão habitual fora do laboratório e um único cochilo monitorado no início da tarde.

A frequência cardíaca média diminuiu de 68,31 ± 10,96 bpm durante a vigília para 63,94 ± 11,35 bpm no sono NREM, correspondendo a uma redução média de 4,38 ± 3,46 bpm. O intervalo de confiança de 95% para a diferença foi de 2,53 a 6,22 bpm. A comparação foi significativa no teste t pareado [$t(15) = 5,06$; $p < 0,001$] e permaneceu

significativa no teste de Wilcoxon (W = 0; p < 0,001), com tamanho de efeito elevado (dz de Cohen = 1,26; n = 16). A concordância entre os testes e o predomínio de reduções individuais tornam esse o achado fisiológico mais consistente do estudo (Figura 3).

A desaceleração cardíaca durante o NREM é compatível com as mudanças autonômicas que acompanham a transição da vigília para o sono. Estudos com cochilos diurnos monitorados por polissonografia também observaram prolongamento dos intervalos RR e redução da frequência cardíaca durante o NREM (CELLINI et al., 2016; ALQATARI et al., 2020). O resultado descreve uma resposta fisiológica aguda e não permite inferir repercussão clínica do cochilo, pois não houve grupo de comparação, medidas repetidas ou seguimento. A literatura sobre sesta e risco cardiovascular também é heterogênea, com achados dependentes da duração, da frequência, das condições de saúde e do contexto do cochilo (SUN et al., 2022).

Entre os índices de variabilidade da frequência cardíaca, o SDNN apresentou diferença global nominal entre vigília, N1, N2 e N3 pelo teste de Friedman [$\chi^2(3) = 11,00$; p = 0,0117; Kendall W = 0,407; n = 9]. As medianas foram de 81,19 ms na vigília, 45,81 ms em N1, 65,24 ms em N2 e 66,22 ms em N3. Nos pós-testes pareados de Wilcoxon, o SDNN foi maior na vigília do que em N1 (p = 0,0391), N2 (p = 0,0117) e N3 (p = 0,0117), sem diferenças entre os estágios do sono. Esses valores são nominais e os pós-testes têm caráter exploratório. Após o ajuste de Benjamini-Hochberg entre os seis índices de VFC, o resultado global do SDNN não permaneceu significativo (p ajustado = 0,0704) (Figura 4).

O SDNN expressa a variabilidade global dos intervalos RR no segmento analisado e sofre influência da duração do registro, da frequência cardíaca, da respiração, da qualidade do sinal e das transições fisiológicas. Desse modo, os valores menores durante o sono não devem ser interpretados isoladamente como pior função autonômica. Recomendações recentes destacam que a VFC depende das condições de aquisição e processamento e que seus índices não são substitutos diretos uns dos outros (QUIGLEY et al., 2024). A reprodutibilidade das medidas também varia conforme o índice e o estágio do sono (HERZIG et al., 2018). Nesta análise, somente nove participantes possuíam dados nas quatro condições, o que amplia a influência de valores individuais.

Não houve diferença global para o RMSSD [$\chi^2(3) = 5,00$; p = 0,1718; Kendall W = 0,185; n = 9]. As medianas foram de 82,53 ms na vigília, 56,00 ms em N1, 69,70 ms em N2 e 69,60 ms em N3 (Figura 5). O pNN50 também não diferiu entre os períodos [$\chi^2(3) = 4,53$; p = 0,2092; Kendall W = 0,168; n = 9], com medianas de 38,05%, 35,16%, 39,85% e 39,33%, respectivamente. Para LF, HF e LF/HF, os testes globais igualmente não foram significativos (p = 0,2261 para cada índice; n = 8). Portanto, a diferença nominal observada no SDNN não foi acompanhada por uma modificação uniforme dos demais parâmetros de VFC. Estudos com cochilos diurnos encontraram alterações em índices dos domínios do tempo e da frequência, mas a direção e a magnitude variaram conforme o estágio, a idade e o protocolo (CELLINI et al., 2016; CHEN et al., 2021).

Entre as correlações previamente selecionadas, a de maior magnitude foi observada entre a pontuação de sintomas depressivos e a frequência cardíaca média no NREM (ρ = 0,794; p = 0,0002; n = 16). Pontuações mais altas estiveram relacionadas a maior frequência cardíaca durante o NREM. Essa foi a única dessas correlações que

permaneceu significativa após o procedimento de Benjamini-Hochberg (p ajustado = 0,0116) (Figura 6). A magnitude da associação e sua permanência após o ajuste conferem destaque a esse resultado entre os achados correlacionais do estudo.

Apesar de estatisticamente forte, essa associação não demonstra que os sintomas depressivos tenham causado elevação da frequência cardíaca nem permite utilizar essa medida como marcador diagnóstico. O estudo avaliou associações transversais entre variáveis, mas não investigou a acurácia diagnóstica da frequência cardíaca por meio de medidas como sensibilidade e especificidade, nem comparou essa medida com um diagnóstico clínico de referência. Além disso, em análises exploratórias adicionais, a pontuação de sintomas depressivos também se associou à frequência cardíaca em vigília ($\rho = 0,640$; $p = 0,0076$; $n = 16$) e à frequência cardíaca média geral da polissonografia ($\rho = 0,692$; $p = 0,0030$; $n = 16$). Esses resultados não integraram o conjunto principal submetido ao ajuste e sugerem que o padrão observado não deve ser considerado específico do NREM. Uma revisão sistemática identificou relações entre depressão, ansiedade e VFC relacionada ao sono, mas também encontrou heterogeneidade entre populações, índices e estágios avaliados (CORREIA et al., 2023). Assim, a magnitude da correlação com a frequência cardíaca no NREM merece atenção, mas sua precisão, sua especificidade e sua aplicabilidade clínica precisam ser avaliadas em amostras maiores.

Em análises exploratórias adicionais, que não integraram a família de correlações submetida ao ajuste, a pontuação de sintomas de insônia apresentou correlação negativa com a redução da frequência cardíaca entre vigília e NREM ($\rho = -0,693$; $p = 0,0029$; $n = 16$). Como valores positivos da diferença representam maior desaceleração, participantes com mais sintomas de insônia tenderam a apresentar menor queda da frequência cardíaca durante o cochilo (Figura 7). O número de despertares registrado na polissonografia apresentou relação semelhante com essa redução ($\rho = -0,556$; $p = 0,0315$; $n = 15$) (Figura 8). Assim, uma medida subjetiva de sintomas e uma medida objetiva de fragmentação apontaram na mesma direção.

Esse padrão é compatível com a hipótese de maior ativação fisiológica em indivíduos com sono fragmentado ou sintomas de insônia, mas não constitui demonstração direta de hiperativação autonômica. Estudos sobre sono noturno descrevem diferenças na frequência cardíaca e na VFC em pessoas com queixas de insônia (COSGRAVE et al., 2021; MA et al., 2024). Em protocolo experimental, a restrição parcial do sono modificou parâmetros autonômicos, enquanto a fragmentação por despertares horários não diferiu significativamente da linha de base (SCHLAGINTWEIT et al., 2023). Assim, os efeitos não são uniformes entre os protocolos. Como as associações foram transversais, características individuais não controladas podem ter contribuído para os resultados.

A pontuação de sintomas de insônia também se correlacionou negativamente com o RMSSD em vigília ($\rho = -0,549$; $p = 0,0419$; $n = 14$) (Figura 9). Na análise leave-one-out, a direção permaneceu negativa em todas as retiradas individuais, com coeficientes entre $-0,646$ e $-0,447$; contudo, o valor de p permaneceu abaixo de 0,05 em oito das 14 repetições. A direção foi relativamente estável, mas a significância dependeu da composição da amostra. Além disso, a associação nominal não permaneceu significativa após o ajuste das correlações previamente selecionadas. Por isso, o achado deve ser

considerado exploratório, e não evidência robusta de alteração autonômica relacionada à insônia.

Para os sintomas depressivos, também foram observadas correlações negativas com RMSSD em vigília ($\rho = -0{,}575$; $p = 0{,}0314$; $n = 14$) e pNN50 em vigília ($\rho = -0{,}544$; $p = 0{,}0442$; $n = 14$). Nenhuma permaneceu significativa após o ajuste para múltiplas comparações. Os resultados acompanham o sentido da associação observada com a frequência cardíaca, mas não sustentam, isoladamente, um padrão uniforme de VFC relacionado aos sintomas depressivos.

O jet lag social correlacionou-se positivamente com o número de despertares estimado pela actigrafia ($\rho = 0{,}518$; $p = 0{,}0477$; $n = 15$) (Figura 10). O resultado foi nominal e não permaneceu significativo após o ajuste, mas contempla o componente circadiano do plano ao sugerir que maior diferença entre os horários de sono em dias de atividade e dias livres pode coexistir com mais interrupções do sono habitual. A direção temporal não pode ser estabelecida. No ambiente universitário, compromissos acadêmicos, profissionais e sociais podem favorecer horários irregulares. O jet lag social também tem sido associado a fatores de risco cardiometabólico nesse contexto (GALENO et al., 2023). Por outro lado, a correlação entre ansiedade e despertares na polissonografia não alcançou significância estatística ($\rho = 0{,}450$; $p = 0{,}0923$; $n = 15$), não havendo base para afirmar uma associação. Também não foi observada associação significativa entre estresse percebido e percentual de vigília na polissonografia ($\rho = -0{,}373$; $p = 0{,}155$; $n = 16$).

Outros resultados nulos ajudam a delimitar o alcance dos achados. Não foram identificadas associações significativas entre qualidade subjetiva do sono, estresse ou ansiedade e as medidas selecionadas de duração, eficiência ou latência do cochilo ($p \geq 0{,}1699$; $n = 16$). Também não houve associação entre as medidas correspondentes da actigrafia e da polissonografia, como tempo total de sono, eficiência, latência e despertares ($p \geq 0{,}1866$; n entre 14 e 15). Esses resultados reforçam que o sono habitual e um único cochilo em laboratório representam contextos relacionados, mas não intercambiáveis.

Em conjunto, os achados mostram que o cochilo diurno foi acompanhado por redução consistente da frequência cardíaca no NREM, enquanto os índices de VFC não apresentaram comportamento uniforme entre os estágios. O SDNN mostrou uma diferença global nominal, sem confirmação após o ajuste entre os seis índices, e RMSSD, pNN50, LF, HF e LF/HF não diferiram. Entre as associações previamente selecionadas, destacou-se a forte relação entre sintomas depressivos e frequência cardíaca no NREM, única correlação que permaneceu significativa após o ajuste para múltiplas comparações. Análises exploratórias adicionais sugeriram, entretanto, que esse padrão não deve ser considerado específico do NREM. De forma exploratória, maior intensidade de sintomas de insônia e maior número de despertares na polissonografia estiveram relacionados a menor desaceleração cardíaca durante o cochilo.

As principais limitações foram o tamanho amostral reduzido, a amostragem por conveniência, o número variável de participantes em cada análise, a curta duração ou a ausência de alguns estágios em parte dos registros e o delineamento transversal. A polissonografia avaliou um único cochilo em laboratório, enquanto a actigrafia

representou o sono habitual, e não houve controle multivariável de fatores como respiração, consumo de estimulantes, atividade física, horário habitual de sono e adaptação ao ambiente experimental. A realização de múltiplas análises também aumenta a possibilidade de achados ocasionais, sobretudo nas associações adicionais. Apesar dessas restrições, a combinação de questionários, actigrafia, polissonografia, frequência cardíaca e VFC permitiu examinar de forma integrada a fragmentação do sono e a resposta cardiovascular durante o cochilo. Os resultados fornecem uma base para estudos com amostras maiores, registros repetidos e protocolos capazes de testar a estabilidade e a especificidade das associações observadas.

Conclusão

Este estudo permitiu caracterizar o sono habitual e o cochilo diurno de adultos vinculados ao contexto universitário, além de examinar suas relações com a frequência cardíaca, a variabilidade da frequência cardíaca e indicadores de saúde do sono. A amostra apresentou elevada frequência de sono subjetivamente ruim e de sintomas de insônia, apesar da baixa frequência de classificação de alto risco para apneia obstrutiva do sono, mostrando que as queixas de sono foram frequentes mesmo em participantes predominantemente jovens.

Durante o cochilo, a frequência cardíaca diminuiu de forma consistente entre a vigília e o sono NREM, constituindo o achado fisiológico mais robusto do estudo. Entretanto, esse resultado representa uma resposta aguda durante o cochilo e não demonstra benefício ou proteção cardiovascular. Os índices de variabilidade da frequência cardíaca não apresentaram comportamento uniforme entre os estágios. A diferença nominal observada para o SDNN não permaneceu significativa após o ajuste para múltiplas comparações, e os demais índices não apresentaram diferenças globais.

Entre as associações previamente selecionadas, a relação entre as pontuações de sintomas depressivos e a frequência cardíaca no NREM foi a única que permaneceu significativa após o ajuste para múltiplas comparações. Como análises adicionais também relacionaram essas pontuações à frequência cardíaca em vigília e à frequência cardíaca média da polissonografia, a associação não deve ser considerada específica do NREM. Em análises exploratórias, maior intensidade de sintomas de insônia e maior número de despertares na polissonografia estiveram relacionados a menor redução da frequência cardíaca durante o cochilo. Por outro lado, não foram significativas as associações planejadas de ansiedade, estresse e qualidade subjetiva do sono com a duração ou a qualidade do cochilo, nem aquelas entre medidas correspondentes da actigrafia e da polissonografia. Portanto, não se sustentou um padrão amplo de relações na amostra.

O tamanho reduzido da amostra, a amostragem por conveniência, a disponibilidade variável de dados, a avaliação de um único cochilo e o delineamento transversal limitam a generalização dos achados e impedem estabelecer relações causais. Dentro desses limites, o estudo demonstrou uma desaceleração cardíaca aguda durante o NREM, sem evidência de alteração uniforme da variabilidade da frequência cardíaca ou de benefício cardiovascular do cochilo. As relações exploratórias com sintomas de insônia e

fragmentação do sono devem ser testadas em amostras maiores, com registros repetidos e maior controle de fatores de confusão.

Referências

ALQATARI, A. A. et al. Changes in heart rate variability and baroreflex sensitivity during daytime naps. Nature and Science of Sleep, v. 12, p. 661-669, 2020. DOI: 10.2147/NSS.S270191.

ANDRECHUK, C. R. S. et al. Cultural adaptation and evaluation of the measurement properties of the Berlin Questionnaire for Brazil. Sleep Medicine, v. 60, p. 182-187, 2019. DOI: 10.1016/j.sleep.2019.03.022.

BERTOLAZI, A. N. et al. Portuguese-language version of the Epworth Sleepiness Scale: validation for use in Brazil. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 35, n. 9, p. 877-883, 2009. DOI: 10.1590/S1806-37132009000900009.

BERTOLAZI, A. N. et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. Sleep Medicine, v. 12, n. 1, p. 70-75, 2011. DOI: 10.1016/j.sleep.2010.04.020.

BOTEGA, N. J. et al. Transtornos do humor em enfermaria de clínica médica e validação de escala de medida (HAD) de ansiedade e depressão. Revista de Saúde Pública, v. 29, n. 5, p. 359-363, 1995. DOI: 10.1590/S0034-89101995000500004.

CASTRO, L. S. Adaptação e validação do Índice de Gravidade de Insônia (IGI): caracterização populacional, valores normativos e aspectos associados. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2011.

CELLINI, N. et al. Heart rate variability during daytime naps in healthy adults: autonomic profile and short-term reliability. Psychophysiology, v. 53, n. 4, p. 473-481, 2016. DOI: 10.1111/psyp.12595.

CHEN, P.-C. et al. Age-related losses in cardiac autonomic activity during a daytime nap. Psychophysiology, v. 58, n. 7, e13701, 2021. DOI: 10.1111/psyp.13701.

CORREIA, A. T. L. et al. Associations between sleep-related heart rate variability and both sleep and symptoms of depression and anxiety: a systematic review. Sleep Medicine, v. 101, p. 106-117, 2023. DOI: 10.1016/j.sleep.2022.10.018.

COSGRAVE, J. et al. Revisiting nocturnal heart rate and heart rate variability in insomnia: a polysomnography-based comparison of young self-reported good and poor sleepers. Journal of Sleep Research, v. 30, n. 4, e13278, 2021. DOI: 10.1111/jsr.13278.

GALENO, D. M. L. et al. Cardiometabolic risk factors and social jetlag in university professors. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 56, e12539, 2023. DOI: 10.1590/1414-431X2023e12539.

GARDANI, M. et al. A systematic review and meta-analysis of poor sleep, insomnia symptoms and stress in undergraduate students. Sleep Medicine Reviews, v. 61, 101565, 2022. DOI: 10.1016/j.smrv.2021.101565.

HERZIG, D. et al. Reproducibility of heart rate variability is parameter and sleep stage dependent. Frontiers in Physiology, v. 8, art. 1100, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2017.01100.

MA, Y. et al. Heart rate variability during sleep onset in patients with insomnia with or without comorbid sleep apnea. Sleep Medicine, v. 122, p. 92-98, 2024. DOI: 10.1016/j.sleep.2024.07.034.

QUIGLEY, K. S. et al. Publication guidelines for human heart rate and heart rate variability studies in psychophysiology—Part 1: physiological underpinnings and foundations of measurement. Psychophysiology, v. 61, n. 9, e14604, 2024. DOI: 10.1111/psyp.14604.

REIS, R. S.; HINO, A. A. F.; AÑEZ, C. R. R. Perceived Stress Scale: reliability and validity study in Brazil. Journal of Health Psychology, v. 15, n. 1, p. 107-114, 2010. DOI: 10.1177/1359105309346343.

ROENNEBERG, T.; WIRZ-JUSTICE, A.; MERROW, M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. Journal of Biological Rhythms, v. 18, n. 1, p. 80-90, 2003. DOI: 10.1177/0748730402239679.

SCHLAGINTWEIT, J. et al. Effects of sleep fragmentation and partial sleep restriction on heart rate variability during night. Scientific Reports, v. 13, n. 1, 6202, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-33013-5.

SMITH, M. T. et al. Use of actigraphy for the evaluation of sleep disorders and circadian rhythm sleep-wake disorders: an American Academy of Sleep Medicine clinical practice guideline. Journal of Clinical Sleep Medicine, v. 14, n. 7, p. 1231-1237, 2018. DOI: 10.5664/jcsm.7230.

ST-ONGE, M.-P. et al. Multidimensional sleep health: definitions and implications for cardiometabolic health: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes, v. 18, n. 5, e000139, 2025. DOI: 10.1161/HCQ.0000000000000139.

SUN, J. et al. Daytime napping and cardiovascular risk factors, cardiovascular disease, and mortality: a systematic review. Sleep Medicine Reviews, v. 65, 101682, 2022. DOI: 10.1016/j.smrv.2022.101682.

TROESTER, M. M. et al. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications. Version 3. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2023.

Anexos



Figura 1: Distribuição dos participantes segundo a classificação do Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (n = 16). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 2: Distribuição dos participantes segundo a gravidade dos sintomas de insônia (n = 16). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 3: Comparação pareada da frequência cardíaca média entre a vigília e o sono NREM (n = 16). As linhas conectam as medidas do mesmo participante e os losangos representam as médias. Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 4: Distribuição do SDNN na vigília e nos estágios N1, N2 e N3 (n = 9). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 5: Distribuição do RMSSD na vigília e nos estágios N1, N2 e N3 (n = 9). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 6: Associação entre sintomas depressivos e frequência cardíaca média no sono NREM (n = 16). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 7: Associação entre sintomas de insônia e redução da frequência cardíaca da vigília para o sono NREM (n = 16). Valores positivos representam redução da frequência cardíaca. Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 8: Associação entre o número de despertares na polissonografia e a redução da frequência cardíaca da vigília para o sono NREM (n = 15). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 9: Associação entre sintomas de insônia e RMSSD durante a vigília (n = 14). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).



Figura 10: Associação entre jet lag social e número de despertares estimado pela actigrafia (n = 15). Fonte: elaboração própria com dados da pesquisa (2026).

CÓDIGO: SB0032

AUTOR: FLAVIO DO NASCIMENTO GOMES

ORIENTADOR: HUGO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ROCHA

TÍTULO: Avaliação in sílico de Tetrassacarídeos da Alga Gracilaria birdiae: Uma Abordagem Complementar no Manejo da Obesidade

Resumo

Neste estudo foi utilizada uma abordagem computacional para desenhar e investigar as características fisiológicas dos tetrassacarídeos da alga Gracilaria birdiae (GBN, GBS1 e GBS2), bem como correlacionar suas propriedades antioxidantes e antiobesidade à via Nrf2/ARE e clarificar sua interação. A analise farmacológica predita por pkCSM indicou que a absorção intestinal é um desafio para os polissacarídeos. Os compostos apresentaram alta solubilidade em água, baixa toxicidade sistêmica e alta permeabilidade dérmica. O docking molecular com Keap1 apresentou uma interação não covalente forte com os tetrassacarídeos, principalmente GBS2, com uma energia de ligação de -11.4 delta. Fazendo pontes de hidrogênio e ligações Pi-Anion com as argininas e outros aminoácidos de Keap1, os compostos exibiram potencial inibição da interação Keap1-Nrf2, podendo atuar como modulador positivo da via antioxidante Nrf2/ARE e servir como adjuvante no tratamento da obesidade e suas complicações associadas.

Palavras-chave: Antioxidantes. Nrf2/ARE. Algas. Patogênese. Saúde

TITLE: In silico Evaluation of Tetrasaccharides from the Alga Gracilaria birdiae: A Complementary Approach in Obesity Management

Abstract

In this study, a computational approach was used to design and investigate the physiological characteristics of the algae's Gracilaria birdiae tetrasaccharides (GBN, GBS1, and GBS2), as well as to correlate their antioxidant and anti-obesity properties to the Nrf2/ARE pathway and clarify their interaction. The pharmacological analysis predicted by pkCSM indicated that intestinal absorption is a challenge for these polysaccharides. The compounds showed high water solubility, low systemic toxicity, and high dermal permeability. Molecular docking with Keap1 showed a strong non-covalent interaction with the tetrasaccharides, especially GBS2, with a binding energy of -11.4 delta. By forming hydrogen bonds and Pi-Anion interactions with arginines and other amino acids of Keap1, the compounds exhibited potential inhibition of the Keap1-

Nrf2 interaction. Thus, they may act as positive modulators of the Nrf2/ARE antioxidant pathway and serve as adjuvants in the treatment of obesity and its associated complications.

Keywords: Antioxidants; Nrf2/ARE; Algae; Pathogenesis; Health

Introdução

A obesidade é uma condição crônica e multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. Em 2022, uma em cada oito pessoas no mundo vivia com obesidade, sendo considerada uma epidemia global devido ao aumento exponencial de sua prevalência nas últimas décadas (WHO, 2004). Além de impactar severamente o sistema público de saúde, a obesidade está intrinsecamente ligada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurológicas, além de comorbidades metabólicas que reduzem significativamente a expectativa de vida (FLORA et al., 2019).

Um dos mecanismos fisiopatológicos centrais que conecta o excesso de adiposidade a essas complicações é o estresse oxidativo sistêmico. A hipóxia e outros fatores pró-inflamatório no tecido adiposo hipertrofiado cruza com a elevada secreção de citocinas inflamatórias como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF-α) (ELLULU et al., 2017). Já foi demonstrado que o TNF-α induz a produção de ROS por meio da ativação da via da subunidade quinase κ fator B β(NF-κB), sendo umas das pontes para a fisiopatologia da obesidade (MARSEGLIA et al., 2014).

Nesse cenário, a via de sinalização do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) desempenha um papel crucial. O complexo Nrf2/Keap1 atua como um sensor mestre da homeostase redox; sua ativação induz a expressão de enzimas citoprotetoras e antioxidantes, oferecendo uma estratégia promissora para mitigar os danos celulares associados à obesidade (RAHMAN et al., 2018; LONG et al., 2022). O Nrf2 é regulado negativamente pela proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1), que monitora a resposta celular ao estresse oxidativo e mantém o Nrf2 em baixas concentrações citoplasmáticas através de um processo de ubiquitinação e subsequente degradação proteassomal. A ativação do Nrf2 ou a inibição de seu regulador negativo Keap1 resulta no acúmulo citosólico e consequente translocação do Nrf2 para o núcleo.

Tradicionalmente, o desenvolvimento de fármacos para esta via focou em inibidores indiretos, que reagem covalentemente com resíduos de cisteína no Keap1 para promover a dissociação do complexo. Em contrapartida, surgem os inibidores diretos da interação proteína-proteína (PPI), que se ligam de forma não-covalente ao Keap1, especificamente no sítio de ligação do Nrf2. Esses novos inibidores visam o domínio Kelch C-terminal da Keap1, competindo diretamente com o sítio de ligação do Nrf2 de uma maneira reversível e estereoquimicamente definida. (ZHUANG et al., 2017).

Pesquisas recentes indicam que polissacarídeos de origem marinha podem atuar como reguladores eficazes dessa via, promovendo uma resposta antioxidante robusta (LONG et al., 2022). Os polissacarídeos de algas vermelhas do gênero Gracilária (Rodophyta) são

constantemente associados ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes de segunda fase SOD, CAT e enzimas do complexo GSH, que classicamente respondem a via antioxidante Nrf2/ARE (RANI et al., 2024). A alga vermelha Gracilaria birdiae destaca-se como uma fonte rica de polissacarídeos sulfatados.

Embora revisões tenham associado a via Nrf2 a polissacarídeos derivados de algas, o entendimento experimental dessa interação ainda representa uma lacuna na literatura (LIU et al., 2020) e para suprir isso, ferramentas de bioinformática se tornaram essenciais. A aplicação de métodos computacionais, como a visualização molecular e o docking molecular, permite prever a afinidade e o modo de interação entre compostos bioativos e seus alvos proteicos (MORRIS et al., 2009), bem como a previsão de características farmacológicas ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019). Considerando o a fisiopatologia associada a obesidade. O presente estudo visa investigar o potencial de terassacarídeos sulfatados G. birdiae na modulação da via Nrf2 através de abordagens in silico, buscando compreender seu papel como agente antioxidante no contexto da obesidade.

Metodologia

2. Metodologia

2.1. Obtenção das Estruturas Tetrassacarídicas (GBN, GBS1 E GBS2)

A estrutura do tetrassacaríde neutra (GBN) foi obtida a partir do PubChem (CID: 119663110) em formato SMILES (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ acessado em 10 de novembro de 2025). As possíveis estruturas dos tetrassacarídeos, foram produzidas de acordo com a literatura, sendo β-D-galactopiranose com ligação 3 (unidade G) e 3,6-anidro-α-L-galactopiranose com ligação 4 (unidade LA) (MACIEL et al., 2008).

Os tetrassacarídeos foram elaborados utilizando o Molview (https://molview.org/ acessado em 10 de novembro de 2025), uma ferramenta online de edição química. Foram adicionados manualmente grupos sulfatos no carbono 4 da primeira β-D-galactopiranose e no carbono 4 da segunda β-D-galactopiranose. O primeiro modelo foi nomeado GBS1, o segundo de GBS2 e o modelo sem alteração, de GBN (neutra). As estruturas foram salvas em formato SMILES.

As versões para ilustrações foram manualmente construídas com a ferramenta online Marvin ((https://freetrial.marvin.cxn.io/ acessado em 12 de novembro de 2025).

2.2 Avaliação ADMET

A investigação das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos tetrassacarídeos GBN, GBS1 e GBS2 foi conduzida por meio do servidor web pkCSM (https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/, acessado em 10 de novembro de 2025). Para o processamento, as representações estruturais dos compostos foram submetidas em

formato SMILES, permitindo a predição sistemática dos parâmetros de ADMET. No domínio da absorção, foram estimados o logaritmo da solubilidade molar em água, a permeabilidade aparente em modelos de células Caco-2 e a taxa de absorção intestinal em humanos, além da permeabilidade cutânea e da afinidade das moléculas como substratos ou inibidores da glicoproteína-P (P-gp). A dinâmica de distribuição foi avaliada através do volume de distribuição em estado de equilíbrio (VDss) e do potencial de transposição das barreiras hematoencefálica (BHE) e do sistema nervoso central (SNC). Simultaneamente, os processos de metabolismo e excreção foram caracterizados pela interação com as principais isoformas do citocromo P450 (CYP), pelo cálculo da depuração corporal total e pela afinidade ao transportador renal de cátions orgânicos 2 (OCT2). A segurança biológica das amostras foi determinada por um perfil de toxicidade abrangente, incluindo a avaliação de mutagenicidade bacteriana pelo teste de AMES, a dose máxima tolerada em humanos (MRTD) e o risco de inibição dos canais de potássio hERG I e II. Adicionalmente, foram previstos os valores de toxicidade aguda (DL50) e crônica (LOAEL) em ratos, bem como o potencial de hepatotoxicidade, sensibilização cutânea e indicadores de ecotoxicidade nos modelos biológicos Tetrahymena pyriformis e peixe-Minnow. O motor preditivo do pkCSM baseia-se em assinaturas estruturais de grafos, as quais interpretam a topologia molecular como redes complexas onde átomos e ligações atuam como nós e arestas, possibilitando a identificação de padrões químicos fundamentais para desfechos farmacocinéticos precisos (PIRES et al., 2015).

2.3 Docking Molecular

Para compreender o mecanismo dos tetrassacarídeos no aumento das enzimas antioxidantes foram feitos ensaios de Docking Molecular in sílico. Os SMILES de GBS1, GBS2 e GBN salvos foram convertidos em arquivos mol com a ferramenta online Marvin. A droga usada como controle positivo é um derivado de 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin (ML334), composto amplamente utilizado para parâmetros em ensaios com Keap1-Nrf2 (QIN et al., 2024). Sua estrutura foi obtida pelo Protein Data Bank (PDB ID: 4L7B), co-cristalizado ao Keap1 e isolado através do Discovery Studio v25.1.0.24284 viewer from BIOVIA. Os tetrassacarídeos foram preparados com ferramentas amplamente utilizadas e estabelecidas na área, como o Avogadro v1 (HANWELL et al., 2012) e o AutoDockTools v1.5.7 (MORRIS et al., 2009). No Avogadro, átomos de hidrogênio foram adicionados às estruturas. As moléculas foram submetidas ao campo de força MMFF94 para gerar conformações de baixa energia e sua conformação foi estabelecida em Random Rotor Search. Subsequentemente, no AutoDockTools, cargas de Gasteiger foram atribuídas, e os arquivos foram salvos no formato PDBQT para análise de docking.

A estrutura 3D do alvo principal, Keap1 (PDB: 2FLU) foi obtido por meio do Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/ acessado em 28 de novembro de 2025) com resolução de 1.50 Å. Com o Discovery, a proteína inicialmente foi otimizada, removendo a água nativa do modelo e seu ligante natural Nrf2, deixando somente a cadeia X, que equivale a Keap1. Esse receptor foi preparado para o docking com AutoDockTools. Hidrogênios polares foram adicionados, cargas atômicas de Kollman foram atribuídas e o arquivo do alvo foi salvo no formato PDBQT, pronto para os estudos de docking molecular.

O docking molecular foi realizado utilizando o AutoDock Vina v1.1.2, um programa de docking de código aberto amplamente utilizado, reconhecido como uma das principais escolhas na área devido ao seu desempenho consistente e melhorias ao longo do tempo. Para cada execução de docking, foi definida uma grid box com dimensões de 40 × 40 ×

40 Å. As coordenadas do sítio de ligação foram obtidas através de Discovery, com as coordenadas do domínio de repetição Kelch da proteína Keap1 (x, y, z) -2.278276, 6.226388, 1.627500, a tríade de argininas (AGR380, ARG415 e ARG483) é considerada uma posição conservada dessa proteína, onde os motifs ETGE e DLG de Nrf2 se ancoram (TONG, K. I et al., 2006) . Os parâmetros de docking foram definidos com uma exaustividade de 22, um máximo de 40 modelos e uma faixa de energia de 20 kcal/mol. Os resultados do docking foram visualizados e as imagens foram geradas utilizando o visualizador Discovery Studio.

Resultados e Discussões

3.1. Desenho dos Tetrassacarídeos

GBN representa a forma neutra (A), sendo a β-D-galactopiranose com ligação 3 (unidade G) e 3,6-anidro-α-L-galactopiranose com ligação 4 (unidade LA) seguida por outra unidade G e unidade L. GBS1 representa a forma sulfatada no carbono 4 da primeira unidade G (B). GBS2 representa a forma sulfatada no carbono 4 da segunda unidade G do tetrassacarídeo (C) (figura 2).

3.2. Resultados ADMET

3.2.1. Absorção

Na avaliação da absorção (tabela 1), os compostos GB-N, GBS1 e GBS2 apresentaram valores de log de solubilidade em água entre -1.913 e -2.900, o que os caracteriza como solúveis.

Nenhum dos compostos exibiu alta permeabilidade em células Caco-2, um modelo in vitro utilizado para prever a absorção intestinal (valores < 0.90). No entanto, foi verificada permeabilidade da pele para todos (valores < -2.5). A absorção intestinal humana prevista para todos os três foi de 0%. Os tetrassacarídeos foram identificados como substratos da Glicoproteína-P (P-gp), mas não como inibidores de suas isoformas I e II.

3.2.2 Distribuição, Metabolismo e Excreção

Em relação à distribuição, os valores de VDss foram baixos (especialmente para GBS1 e GBS2, com -0.334 e -0.492, respectivamente), indicando uma distribuição tecidual limitada. A permeabilidade à barreira hematoencefálica (BBB) também foi baixa, com valores abaixo de -1 para todos.

No metabolismo, nenhum composto interagiu como substrato ou inibidor das isoformas do Citocromo P450 (CYP). Quanto à excreção, apresentaram depurações parecidas (entre 1.467 e 1.505) e nenhum dos tetrassacarídeos foram avaliadas como substrato do Organic Cationic Transporter 2 (OCT2), envolvido na eliminação de fármacos e compostos endógenos (tabela 1).

3.2.3 Toxicidade

Na avaliação da toxicidade (Tabela 2), os tetrassacarídeos não demonstraram potencial mutagênico no teste AMES. A dose máxima tolerada (MRTD) para humanos foi inferior ao limiar de 0.477 para todos. Quanto à interação com canais de potássio, nenhuma das amostras inibiu a hERG I; entretanto, GBN foi identificada como inibidora de hERG II.

Nos testes de toxicidade oral em ratos, GBS1 apresentou o menor valor de LD50 (2.489), enquanto GB-N obteve o maior (2.601). Para a toxicidade crônica (LOAEL), a GBS2 exibiu a menor dose (3.802) e GBS1 a maior (4.536). Nenhum dos tetrassacarídeos foi associada a eventos de hepatotoxicidade ou sensibilização cutânea.

Na análise de ecotoxicidade, os valores de LC50 para o Peixe-minnow foram significativamente superiores ao limite de 0.5 mM, variando entre 14.302 e 16.240. Em contraste, no modelo T. pyriformis, todas as amostras apresentaram valores de 0.285, excedendo o limite de -0.5ug/L e indicando toxicidade para este microrganismo.

3.3 Docking Molecular

Os dockings de GBN, GBS1 e GBS2 contra o sítio Kelch de Keap1 mostrou energias de ligação de -10.1, -11.1 e -11.4 respectivamente, comparando com a droga ML334, com energia de ligação -10.4 (tabela 3).

Os ensaios de docking molecular revelaram perfis de reconhecimento e afinidade eletrônica distintos entre os ligantes avaliados e o sítio ativo de Keap1 (figura 2). Os derivados GBS1, GBS2 e GBN demonstraram forte dependência de redes hidrofílicas para sua estabilização conformacional, refletindo a natureza polar de suas estruturas. O complexo Keap1-GBN foi ancorado de forma puramente hidrofílica, sustentado exclusivamente por pontes de hidrogênio convencionais com os resíduos GLY433, ARG415, SER555, ARG483, ARG380 e HIS436. No docking de GBS1 e GBS2, o resíduo ARG380 se mostrou um hotspot eletrostático crucial, estabelecendo interações de carga atrativa (attractive charge) direcionadas aos grupamentos aniônicos dos ligantes, sendo este efeito centralizado de forma múltipla na estrutura do GBS2. Adicionalmente, o GBS1 foi diferenciado pela rigidez conformacional induzida por uma interação do tipo pi-ânion com a TYR334. O ligante ML334 apresentou um mecanismo de ligação governado majoritariamente por forças hidrofóbicas. O perfil de ancoragem do ML334 foi dominado por interações do tipo pi-pi T-shaped com o resíduo TYR572 e uma densa rede de interações pi-alkyl envolvendo ARG415, ALA556, TYR525 e PHE577, restringindo as pontes de hidrogênio a ARG380 e SER555.

Os ensaios de docking molecular revelaram perfis de reconhecimento e afinidade eletrônica distintos entre os ligantes avaliados e o sítio ativo de Keap1 (figura 2). Os derivados GBS1, GBS2 e GBN demonstraram forte dependência de redes hidrofílicas para sua estabilização conformacional, refletindo a natureza polar de suas estruturas. O complexo Keap1-GBN foi ancorado de forma puramente hidrofílica, sustentado exclusivamente por pontes de hidrogênio convencionais com os resíduos GLY433, ARG415, SER555, ARG483, ARG380 e HIS436. No docking de GBS1 e GBS2, o resíduo ARG380 se mostrou um hotspot eletrostático crucial, estabelecendo interações de carga atrativa (attractive charge) direcionadas aos grupamentos aniônicos dos ligantes, sendo este efeito centralizado de forma múltipla na estrutura do GBS2. Adicionalmente,

o GBS1 foi diferenciado pela rigidez conformacional induzida por uma interação do tipo pi-ânion com a TYR334. O ligante ML334 apresentou um mecanismo de ligação governado majoritariamente por forças hidrofóbicas. O perfil de ancoragem do ML334 foi dominado por interações do tipo pi-pi T-shaped com o resíduo TYR572 e uma densa rede de interações pi-alkyl envolvendo ARG415, ALA556, TYR525 e PHE577, restringindo as pontes de hidrogênio a ARG380 e SER555.

4. Discussões

Na avaliação do perfil ADMET, os tetrassacarídeos GBN, GBS1 e GBS2 demonstraram elevada solubilidade em água, propriedade que favorece os processos de distribuição e excreção (SAVANJI et al., 2012). Contudo, os modelos preditivos indicaram uma absorção nula. Esse perfil é característico de polissacarídeos de elevada massa molecular e carga líquida negativa, fatores que frequentemente resultam em baixa permeabilidade em modelos de células Caco-2 (RICARD-BLUM et al., 2024). Em contrapartida estudos com o fucoidan, um polissacarídeo de algas marrons, demonstraram permeabilidade in vitro em células Caco-2, absorção intestinal e presença desse polissacarídeo em células de Kupffer no fígado de ratos (NAGAMINE et al., 2014).

Os tetrassacarídeos de G. birdiae também foram identificados como potenciais substratos da Glicoproteína-P (P-gp), uma proteína de transporte que atua como bomba de efluxo transmembranar. Essa interação sugere que a P-gp contribui para a baixa permeabilidade observada, ao promover a extrusão ativa dessas moléculas da célula para o meio extracelular. Todavia, o fato de não atuarem como inibidoras da P-gp é um dado positivo, pois minimiza o risco de interações medicamentosas clínicas que poderiam ocorrer pela interferência no transporte de outros fármacos dependentes dessa via (AYRTON; MORGAN et al., 2001).

Quanto à permeabilidade cutânea, os tetrassacarídeos apresentaram índices elevados, o que sugere a viabilidade da via transdérmica como uma estratégia de entrega para esses compostos. Os baixos valores de Volume de Distribuição no estado de equilíbrio (VDss), indicando que possuem distribuição limitada a tecidos específicos, tendendo a permanecer na circulação sistêmica ou no espaço extracelular. Adicionalmente, a incapacidade de transpor a barreira hematoencefálica (BHE) é um indicador de segurança farmacológica, uma vez que minimiza o risco de efeitos adversos ou neurotoxicidade no sistema nervoso central (SNC) (GOMBAR; HALL, 2013).

Nenhum dos compostos avaliados atuou como substrato ou inibidor das isoenzimas do citocromo P450 (CYP450). Este é um resultado que indica uma elevada estabilidade metabólica frente à biotransformação de fase I, sugerindo que os compostos possam atingir o alvo molecular (Keap1) sem degradação prematura. Além disso, a ausência de interação com o sistema CYP450 minimiza significativamente o risco de interações medicamentosas clinicamente relevantes (LYNCH; PRICE, 2007).

Na avaliação da excreção, os tetrassacarídeos não atuaram como substratos do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), sugerindo que esses compostos não sofrem secreção tubular renal ativa por essa via. Adicionalmente, observou-se uma depuração (clearance) total reduzida, especialmente para GBS2, o que indica uma meia-vida biológica prolongada e potencial para maior exposição sistêmica. Todavia um estudo com fucoidan relata que após 3g da administração do polissacarídeo em 396 indivíduos, 385

apresentaram o composto na urina, indicando que além de absorção há também uma excreção segura desses compostos derivados de algas marinhas (KADENA et al., 2018)

Quanto ao perfil toxicológico, os resultados foram promissores; os tetrassacarídeos não apresentaram potencial mutagênico no ensaio de AMES, o que reforça a ausência de carcinogenicidade genotípica para esses compostos (MORTELMANS; ZEIGER., 2000).

Os baixos valores de Dose Terapêutica Máxima Recomendada (MRTD) obtidos para os tetrassacarídeos sugerem, a princípio, um potencial tóxico em doses reduzidas. Entretanto, estudos in vivo relatam que os polissacarídeos das macroalgas (verdes, marrons e vermelhas) não possuem efeitos nocivos a modelos de animais ((LATORRE-REDOLI et al., 2025).

Nenhum dos tetrassacarídeos avaliados foram identificados como inibidor da isoforma hERG I (hERG 1a), componente principal dos canais de potássio repolarizantes do miocárdio. Contudo, GBN demonstrou potencial inibitório sobre a hERG II (hERG 1b), sugerindo uma interação específica com esta subunidade no tecido cardíaco. Embora a inibição de canais hERG esteja classicamente associada ao prolongamento do intervalo QT e ao risco de arritmias (NEMATI et al., 2023), tais efeitos são predominantemente mediados pela isoforma hERG I. Visto que a hERG II atua como uma proteína acessória com função modulatória sobre a hERG I, a relevância clínica desta inibição isolada pela GBN requer investigação adicional para determinar seu impacto real na condutividade cardíaca (VANDENBERG et al., 2012).

As predições com macromoléculas devem ser interpretadas com cautela, uma vez que a complexidade estrutural e a massa molecular de polissacarídeos divergem significativamente dos scaffolds de moléculas pequenas (small molecules) utilizados no treinamento da maioria dos modelos preditivos (PIRES et al., 2015). Outros estudos in silico com dissacarídeos sulfatados de algas vermelhas apresentaram valores de MRTD elevados, o que indica que o aumento da cadeia oligossacarídica pode enviesar a análise em algoritmos baseados em descritores moleculares convencionais (SILVA; M; ROCHA., 2025).

Nos ensaios de toxicidade oral aguda e crônica em modelos murinos, todos os tetrassacarídeos demonstraram que a dose necessária para desencadear efeitos adversos é extremamente elevada. Esses resultados sugerem uma ampla margem de segurança in vivo.

Os tetrassacarídeos não apresentaram evidências de hepatotoxicidade, sugerindo um perfil de segurança que minimiza o risco de patologias hepáticas crônicas. Adicionalmente, no ensaio de sensibilização cutânea (skin sensitization). Também não demonstraram potencial alergênico ou de hipersensibilidade dérmica. Em termos de ecotoxicidade, os compostos não exibiram toxicidade frente ao modelo Flathead Minnow, com valores de LC50 que indicam segurança ambiental (FERREIRA et al., 2019). Esses achados são complementados por estudos recentes que demonstram o efeito não tóxico e até protetivo de polissacarídeos de G. birdiae contra espécies reativas de oxigênio (ROS) no modelo in vivo Zebrafish, reforçando seu potencial antioxidante (SILVA et al., 2026).

Por outro lado, os tetrassacarídeos exibiram toxicidade contra o protozoário ciliado Tetrahymena pyriformis. Visto que este organismo é amplamente utilizado como modelo

biológico no rastreio de agentes antiprotozoários, tais achados sugerem que esses carboidratos possuem potencial farmacológico como novos agentes antiparasitários (CHEREMNYKH et al., 2022). Essa toxicidade seletiva aponta para a viabilidade do uso das em terapias direcionadas, onde a segurança demonstrada em modelos superiores contrasta favoravelmente com a eficácia contra patógenos unicelulares.

No docking molecular, quanto mais negativa a energia de ligação, mais estável é o complexo formado (RICCIONI, F et al., 2020). Os tetrassacarídeos demonstram energias de ligação semelhantes a droga ML334, que evidências in vitro expõem afinidade pelo Keap1 (HU et al., 2013; QIN et al., 2024).

As argininas, carregadas positivamente, compõem a tríade fundamental no domínio da Keap1 onde o Nrf2 se ancora. Especificamente, o grupo sulfato de GBS1 e GBS2 interagiu com o resíduo ARG380 com ligação eletrostática, indicando que a sulfatação desses tetrassacarídeos é importante no acoplamento com a proteína. A presença de ligações do tipo Pi-Anion e pontes de hidrogênio (H-bond), somada à energia negativa de ligação semelhante à ML334 dos tetrassacarídeos, são sugestivas de uma possível inibição da formação proteína-proteína (PPI) do complexo Keap1-Nrf2.

Esse bloqueio impediria a degradação proteassomal do Nrf2, favorecendo sua atuação como fator de transcrição para a via antioxidante Nrf2/ARE (figura 3) (LONG et al., 2022). Além da capacidade antioxidante direta dos polisscarídeos de G. birdiae (SILVA et al., 2026), esses compostos talvez possam atuar como um modulador positivo da via antioxidante Nrf2/ARE, resultando no aumento de enzimas que podem neutralizar espécies reativas de oxigênio e intervir no estresse oxidativo crônico, um dos principais motores da inflamação sistêmica de baixo grau, potencializando a defesa antioxidante endógena e neutralizando as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são excessivamente produzidas no tecido adiposo disfuncional. Ao reduzir o estresse oxidativo, os tetrassacarídeos poderiam interromper o gatilho inflamatório e oxiditavo que retroalimenta a resistência à insulina, a peroxidação lipídica, formação de placas de ateroma e outras complicações metabólicas derivadas (ASHRAF et al., 2019; PLUTA et al., 2021; KIM et al., 2023).

Conclusão

5. Conclusões

O presente estudo demonstrou que os tetrassacarídeos avaliados (GBN, GBS1 e GBS2) apresentam um potencial altamente promissor como novos ligantes do sítio Kelch de Keap1, se comparando, em termos de afinidade eletrônica, ao fármaco de referência ML334. Os ensaios de docking molecular revelaram que, ao contrário do perfil majoritariamente hidrofóbico do ML334, os derivados ancoram-se por meio de redes hidrofílicas. No ADMET, os compostos exibiram vantagens significativas, como a ausência de potencial mutagênico (teste AMES), ausência de hepatotoxicidade e de sensibilização cutânea, além de não interferirem nas isoformas do Citocromo P450 (CYP) ou no transportador OCT2. Adicionalmente, mostraram-se seguros para o modelo de ecotoxicidade em Peixe-minnow, porém tóxicos para T. pyruforms. Contudo, o avanço

destes tetrassacarídeos como candidatos a fármacos requer estratégias de otimização estrutural para superar limitações biológicas específicas como os baixos valores de VDSS e a restrita permeabilidade à barreira hematoencefálica (BBB). O composto GBN requer cautela devido à sua predita ação como inibidor de hERG II. São necessários mais estudos in vitro e in vivo para a elucidação do potencial dos compostos.

Referências

Referências Bibliográficas

ARAKI, C. Some recent studies on polysaccharides of agar-type. Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax, p. 3-17, 1966.

ASHRAF, M. I. et al. Nrf2 as a Potential Mediator of Cardiovascular Risk in Metabolic Diseases. Frontiers in Pharmacology, v. 10, art. 382, p. 1-13, abr. 2019.

AYRTON, A.; MORGAN, P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. Xenobiotica, [s. l.], v. 31, p. 469–497, 2001.

BAIRD, L. et al. Monitoring Keap1–Nrf2 interactions in single live cells. Biotechnology Advances, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1133-1144, 2014.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nature Reviews Drug Discovery, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 205–214, 2004.

CRISMAN, E. et al. KEAP1-NRF2 protein-protein interaction inhibitors: Design, pharmacological properties and therapeutic potential. Medicinal Research Reviews, [s. l.], v. 42, p. 21925, 2022.

ELLULU, M. S. et al. Obesity and inflammation: The linking mechanism and the complications. Archives of Medical Science, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET modeling approaches in drug discovery. Drug Discovery Today, [s. l.], v. 24, p. 1157–1165, 2019.

FIDELIS, G. P. et al. Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, Gracilaria birdiae. Molecules, [s. l.], v. 19, p. 18511–18526, 2014.

FLORA, G. D.; NAYAK, M. K. A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. Current Pharmaceutical Design, [s. l.], v. 25, n. 38, p. 4063-4084, 2019.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. Journal of Clinical Investigation, [s. l.], v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GOMBAR, V. K.; HALL, S. D. Quantitative structure–activity relationship models of clinical pharmacokinetics: Clearance and volume of distribution. Journal of Chemical Information and Modeling, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 948–957, 2013.

GUSTI, A. M. T. et al. Antioxidants-Related Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPX), Glutathione-S-Transferase (GST), and Nitric Oxide Synthase (NOS) Gene Variants Analysis in an Obese Population: A Preliminary Case-Control Study. Antioxidants, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 595, 2021.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. Journal of Cheminformatics, [s. l.], v. 4, p. 17, 2012.

KADENA, K. et al. Absorption Study of Mozuku Fucoidan in Japanese Volunteers. Marine Drugs, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 393, 2022.

KIM, J. A. et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Insulin Resistance, and Nrf2-Mediated Oxidative Stress Response — Toward an Actionable Strategy for Anti-Aging. Antioxidants, v. 12, n. 11, p. 1900, out./nov. 2023.

LATORRE-REDOLI, S. et al. Exploring Marine-Derived Polysaccharides Through In Vitro and Zebrafish In Vivo Assays: Initial Trends of A Novel Approach to Drug Screening. Marine Biotechnology, New York, v. 27, art. 161, p. 1-18, 2025

LIU, Z.; SUN, X. A Critical Review of the Abilities, Determinants, and Possible Molecular Mechanisms of Seaweed Polysaccharides Antioxidants. International Journal of Molecular Sciences, [s. l.], v. 21, p. 7774, 2020.

LO, S. C. et al. Structure of the Keap1: Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. The EMBO Journal, [s. l.], v. 25, n. 15, p. 3605-3617, 2006.

LONG, X. et al. Antioxidant activity of Gracilaria lemaneiformis polysaccharide degradation based on Nrf-2/keap-1 signaling pathway in HepG2 cells with oxidative stress induced by H(2)O(2). Marine Drugs, [s. l.], v. 20, p. 545, 2022.

LYNCH, T.; PRICE, A. M. Y. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. American Family Physician, [s. l.], v. 76, p. 391–396, 2007.

MACIEL, J. S. et al. Structural characterization of sulfated galactans from the red seaweeds Gracilaria birdiae and Gracilaria cornea. Carbohydrate Polymers, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 475–483, 2008.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. Journal of Computational Chemistry, [s. l.], v. 30, p. 2785–2791, 2009.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella mutagenicity assay. Mutation Research, [s. l.], v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

NAGAMINE, T. et al. Intestinal absorption of fucoidan extracted from the brown seaweed, Cladosiphon okamuranus (Absorção intestinal de Fucoidan extraída da alga marrom, Cladosiphon okamuranus). Marine Drugs, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 48, 2020.

NEMATI, M. et al. Impact of antipsychotics and antidepressants drugs on long QT syndrome induction related to hERG channel dysfunction: A systematic review. Biochemical and Biophysical Research Communications, [s. l.], v. 681, p. 90–96, 2023.

OLIVEIRA, F. S. et al. In vivo evaluation of the antioxidant activity and protective action of the seaweed Gracilaria birdiae. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, [s. l.], v. 2018, 5635848, 2018.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. Journal of Medicinal Chemistry, [s. l.], v. 58, p. 4066–4072, 2015.

PLUTA, W. et al. Nrf2 and Heme Oxygenase-1 Involvement in Atherosclerosis Related Oxidative Stress. Antioxidants, v. 10, n. 9, p. 1463, set. 2021.

QIN, Y. et al. Structure-Guided Conformational Restriction Leading to High-Affinity, Selective, and Cell-Active Tetrahydroisoquinoline-Based Noncovalent Keap1-Nrf2 Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry, [s. l.], v. 67, p. 18828-18864, 2024.

RAHMAN, M. S. et al. A novel antioxidant peptide, purified from Bacillus amylolique-faciens, showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression. Food Chemistry, [s. l.], v. 239, p. 502–510, 2018.

RANI, A. et al. A concise review on the bioactive potential of the genus Gracilaria (Rhodophyta). The Nucleus, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 161-177, 2024.

RICARD-BLUM, S. et al. A biological guide to glycosaminoglycans: Current perspectives and pending questions. FEBS Journal, [s. l.], v. 291, p. 3331–3366, 2024.

RICCIONI, F. et al. (2020). Molecular Docking: A Powerful Tool in Structure-Based Drug Design. In: Biomedicines, 8(10), 401.

AVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: Importance and enhancement techniques. International Scholarly Research Notices, [s. l.], v. 2012, 195727, 2012.

SILVA, O. L. T.; ALVES, M. G. C. F.; ROCHA, H. A. O. Exploring the Pharmacological Potential of Carrageenan Disaccharides as Antitumor Agents: An In Silico Approach. Marine Drugs, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 6, 2025.

SILVA, R. O. et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed Gracilaria birdiae prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. Marine Drugs, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 2618-2633, 2012.

SOUZA, B. W. S. et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed Gracilaria birdiae. Process Biochemistry, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 81-87, 2012.

TONG, K. I. et al. Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. Molecular and Cellular Biology, [s. l.], v. 26, p. 2887–2900, 2006.

VANDENBERG, J. I. et al. hERG K+ channels: structure, function, and clinical significance. Physiological Reviews, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 1393-1478, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Geneva: WHO, 2024.

ZHUANG, C. et al. Small molecule inhibitors of the Keap1–Nrf2 protein–protein interaction. Medicinal Research Reviews, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 190-236, 2017.

Anexos



Figura 1. Envolvimento da inflamação de baixo grau da obesidade formando ROS e a patogênese da obesidade. Created in https://BioRender.com.



Figura 2. Tetrassacarídeos desenhados



Tabela 1. Resultados da Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção de GBN, GBS1 e GBS2.



Figura 3. Interações contra o domínio Kelch de Keap realizadas por A: GBN com carbonos pretos, B: GBS1 com carbonos azuis, C: GBS2 com carbonos laranjas e D: ML334



Figura 4. Via de degradação de Nrf2 em condições constitutivas (esquerda) e ilustração da inibição proteína-proteína dos tetrassacarídeos (direita). Created in https://BioRender.com.



Tabela 2. Resultados do perfil de Toxicidade de GBN, GBS1 e GBS2



Tabela 3. Comparação das energias de ligação dos tetrassacarídeos GBN, GBS1 e GBS2 e a droga controle positivo ML334

CÓDIGO: SB0062

AUTOR: LETICIA DE SOUZA VIDAL

ORIENTADOR: SILVIA REGINA BATISTUZZO DE MEDEIROS

TÍTULO: MODULAÇÃO EPIGENÉTICA INDUZIDA PELO RETENO: Avaliação do perfil de metilação global em células pulmonares não neoplásicas e neoplásicas

Resumo

Este trabalho investigou os efeitos epigenéticos do Reteno (RET), um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) amplamente utilizado como marcador da queima de biomassa, sobre células pulmonares humanas não neoplásicas (BEAS-2B) e neoplásicas (A549). O estudo avaliou a citotoxicidade do composto por meio do ensaio de MTT em concentrações ambientalmente relevantes (10, 30 e 60 ng/mL) e mais elevadas (até 480 ng/mL), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados demonstraram que o RET não apresentou caráter citotóxico em nenhuma das condições testadas. Em seguida, o perfil de metilação global do DNA foi avaliado pelo imunoensaio ELISA, revelando hipometilação global acentuada e estatisticamente significativa em ambas as linhagens, independentemente da concentração ou do tempo de exposição. Complementarmente, a análise de dados de sequenciamento de RNA de células BEAS-2B expostas a 32 ng/mL de RET revelou tendências de repressão da expressão gênica, das famílias enzimáticas das metilases DNMTs e demetilases TET às 24 horas, com inversão para valores positivos às 72 horas, indicando tendência de aumento da expressão gênica, embora sem significância estatística. Os achados podem apontar para mecanismos pós-transcricionais como prováveis mediadores da hipometilação observada, incluindo modificações pós-traducionais das DNMTs, estresse oxidativo e regulação por miRNAs. Os resultados ampliam o conhecimento sobre a toxicidade do RET, posicionando-o como modulador epigenético.

Palavras-chave: Poluição do Ar. Reteno. Metilação do DNA.

TITLE: RETENE-INDUCED EPIGENETIC MODULATION: Evaluation of the global methylation profile in non-neoplastic and neoplastic lung cells

Abstract

This study investigated the epigenetic effects of Reteno (RET), a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) widely used as a marker of biomass burning, on human non-neoplastic (BEAS-2B) and neoplastic (A549) lung cells. The study assessed the cytotoxicity of the compound using the MTT assay at environmentally relevant

concentrations (10, 30, and 60 ng/mL) and higher concentrations (up to 480 ng/mL), at 24-, 48-, and 72-hour time points. The results demonstrated that RET did not exhibit cytotoxicity under any of the tested conditions. Subsequently, the global DNA methylation profile was assessed by ELISA, revealing marked and statistically significant global hypomethylation in both cell lines, regardless of concentration or exposure time. In addition, analysis of RNA sequencing data from BEAS-2B cells exposed to 32 ng/mL of RET revealed trends toward repression of gene expression in the DNMT methyltransferase and TET demethyltransferase enzyme families at 24 hours, with a reversal to positive values at 72 hours, indicating a trend toward increased gene expression, although not statistically significant. These findings may point to post-transcriptional mechanisms as likely mediators of the observed hypomethylation, including post-translational modifications of DNMTs, oxidative stress, and regulation by miRNAs. The results expand our understanding of RET toxicity, positioning it as an epigenetic modulator.

Keywords: Air Pollution. Retene. DNA Methylation

Introdução

A poluição do ar é caracterizada por ser uma mistura complexa de compostos vinda de fontes naturais, como vulcões e queimadas, e antropogênicas, a exemplo da agricultura, indústria e veículos automotores, classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como carcinogênica desde 2013 (IARC, 2013). Dentre seus componentes, a queima de biomassa é uma fonte extremamente relevante em regiões tropicais, expondo bilhões de pessoas globalmente.

O material particulado (MP), componente central dessa poluição, é classificado por seu diâmetro e contém em sua composição metais, sais, compostos orgânicos, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs; Brito, Araújo & Silva, 2018). No Brasil, os níveis de MP2,5 excedem quase o dobro do limite da Organização Mundial da Saúde (OMS; CNN Brasil, 2024), e possuem capacidade de penetrar profundamente nos pulmões causando efeitos cardiovasculares e respiratórios. Estudos experimentais mostram que o MP2,5 induz inflamação pulmonar, prejudica parâmetros fisiológicos em modelos animais e está associado a milhões de mortes anuais por DPOC, infecções respiratórias, doenças cardíacas e câncer de pulmão (Techapichetvanich et al., 2025).

Os HPAs são subprodutos de combustão incompleta, dividem-se em baixo e alto peso molecular, sendo estes últimos mais carcinogênicos, como o benzo[a]pireno, classificado grupo 1 pela IARC (Kim et al., 2013). Mecanicamente, os HPAs são ativados por enzimas hepáticas (CYP1A1/1B1) formando adutos de DNA que, quando não reparados, geram mutações capazes de iniciar a carcinogênese. Estudos in vitro e in vivo demonstram seu potencial genotóxico (formação de micronúcleos), efeitos endócrinos e pró-apoptóticos em células placentárias humanas (Takam et al., 2024; Drwal et al., 2017).

O Reteno (RET) é um HPA não prioritário formado por três anéis aromáticos, derivado do fenantreno, gerado pela degradação de resinas vegetais durante queimadas ou por processos anaeróbicos, sendo usado como marcador de queima de biomassa (Ramdahl, 1983; Tavendale et al., 1997). É encontrado tanto no ar quanto em ambientes aquáticos, onde efluentes de fábricas de celulose contaminam sedimentos em concentrações muito

acima dos níveis naturais (Leppänen, Kukkonen & Oikari, 2000; Seinfeld & Pandis, 2016). Estudos toxicológicos mostram que o RET causa efeitos cardiotóxicos em embriões de peixe (alterações transcriptômicas, redução da frequência cardíaca; Vehniäinen et al., 2016), danos ao DNA por estresse oxidativo (Scaramboni et al., 2023) em células hepáticas e pulmonares humanas, provoca disfunção mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio, instabilidade genômica e morte celular, porém ainda não há estudos que retratem o efeito do RET na epigenética.

Diante do exposto, a epigenética estuda alterações herdáveis na expressão gênica sem mudança na sequência do DNA (Fitz-James & Cavalli, 2022). A metilação do DNA, mecanismo epigenético mais estudado, ocorre pela adição de um grupo metil à citosina em ilhas CpG, geralmente reprimindo a transcrição gênica. As DNMTs (DNMT1, 3A, 3B, 3L) estabelecem e mantêm esses padrões, enquanto as enzimas TET promovem a desmetilação ativa. Padrões anormais de metilação estão associados a doenças, incluindo câncer, ao silenciar genes supressores tumorais ou ativar oncogenes. Dessa forma, o RET pode permanece pouco investigado quanto ao seu potencial de alterar a homeostase epigenética, o que motivou o estudo proposto: avaliar seu efeito sobre a metilação global do DNA em células pulmonares neoplásicas e não neoplásicas.

Metodologia

O estudo utilizou duas linhagens celulares pulmonares humanas, A549 (adenocarcinoma pulmonar) e BEAS-2B (epitélio brônquico não tumoral), cultivadas sob condições ideais em laboratório. Ambas as linhagens foram expostas ao RET em três concentrações (10, 30 e 60 ng/mL), sendo a dose de 30 ng/mL baseada em estudos prévios que a associam à quantidade de RET presente em 400 µg/mL de MP da região amazônica (Alves et al., 2017). Concentrações mais elevadas (120 e 480 ng/mL) também foram testadas para identificar um limiar citotóxico do composto. O DMSO foi utilizado como solvente do RET e do benzo[a]pireno (B[a]P), e também como controle negativo, sem exceder 0,1% na cultura.

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT, que mede a redução mitocondrial do sal de tetrazólio a formazan como indicador de viabilidade celular. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com RET ou B[a]P (1 µg/mL, controle positivo) por 24 e 72 horas, seguido de incubação com MTT e leitura de absorbância a 570 nm. Um segundo ensaio, com doses crescentes (30, 120 e 480 ng/mL) e tempos de 24, 48 e 72 horas, foi conduzido para determinar a concentração citotóxica do composto. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental, com resultados expressos em porcentagem relativa ao controle negativo.

A metilação global do DNA foi mensurada pelo kit Zymo Research™ 5-mC DNA ELISA, um ensaio imunoenzimático que utiliza anticorpo monoclonal específico para 5-metilcitosina (5-mC), com quantificação baseada em curva padrão gerada por controles de referência (DNA ~100% e ~0,5% metilado). Os valores obtidos foram comparados a parâmetros da literatura sobre o estado basal de metilação de células pulmonares saudáveis e tumorais, tomando como referência os níveis de metilação global do elemento transponível LINE-1 (cerca de 50% em linhagens tumorais e entre 67-75% em tecido

pulmonar não tumoral adjacente; Vaissière et al., 2009), bem como a redução relativa de aproximadamente 20% na metilação de células tumorais em comparação às não transformadas, descrita para as mesmas linhagens (BEAS-2B e A549) usadas neste trabalho (Tajbakhsh et al., 2022).

A expressão do maquinário epigenético (as DNA metiltransferases DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, e as desmetilases TET1, TET2 e TET3) foi avaliada de forma direcionada, a partir de dados de RNA-seq previamente gerados por Da Silva Junior et al. (2025) para células BEAS-2B expostas a 32 ng/mL de RET em 24 e 72 horas, com dados normalizados via pacote DESeq2. A triagem dos genes de interesse utilizou identificadores do Ensembl, e a regulação diferencial foi expressa como log2 Fold Change (razão logarítmica entre expressão no grupo tratado e no controle), com significância definida por padj < 0,05 (correção de Benjamini-Hochberg), sem aplicação de limiar mínimo de magnitude, de modo a preservar a sensibilidade para detectar alterações transcricionais sutis. Os gráficos foram produzidos no ambiente R com o pacote ggplot2, destacando visualmente por cores o status de significância de cada enzima. Essa etapa foi conduzida em parceria com pesquisadores do BioME (IMD/UFRN).

Por fim, os dados dos ensaios in vitro foram analisados estatisticamente por ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey para comparações entre médias, considerando-se significativos valores de $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.1).

Resultados e Discussões

O ensaio de MTT mostrou que o RET não foi citotóxico para nenhuma das linhagens (BEAS-2B e A549), mantendo viabilidade acima de 70% na maioria das condições testadas, incluindo concentrações ambientalmente relevantes (10-60 ng/mL) e mais elevadas (até 480 ng/mL), em 24, 48 e 72h. A única exceção foi a A549 exposta a 30 ng/mL em 48h e 72h, que foi um pouco abaixo do limiar de 70%, resultado este que precisa ser interpretado com cautela devido ao alto desvio padrão. Esse achado corrobora estudos prévios (Peixoto et al., 2019; Scaramboni et al., 2023) que também não observaram citotoxicidade relevante do RET em células pulmonares e hepáticas. Ademais, a ausência de toxicidade pode ser relacionada ao fenômeno de hormese, descrito por Da Silva Junior et al. (2025), em que baixas doses de um composto tóxico, neste caso o RET, estimulariam proliferação celular e produção de ATP.

Como resultado da metilação do DNA, realizado através da mensuração pelo ensaio ELISA, os dados revelaram hipometilação global acentuada e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em ambas as linhagens, em todas as concentrações e tempos testados, porém sem relação dose-resposta clara. Isso pode sugerir que mesmo na menor dose (10 ng/mL), o efeito do RET já é saturado. Isso é discutido à luz da hormese e de estudos que mostram HPAs induzindo hipometilação em doses baixas mas genotoxicidade predominante em doses altas (Duca et al., 2018).

Além disso, uma limitação metodológica importante é o grupo controle não-tratado (NT), o qual não foi processado em paralelo com os experimento devido à problemas no kit, então foram usados valores de referência da literatura (Vaissière et al., 2009; Tajbakhsh

et al., 2022) baseados em metilação de LINE-1 para estas células. A metodologia é distinta do ELISA usado nos grupos tratados, o que limita a comparabilidade direta. Ainda assim, a convergência de ambas as linhagens para níveis muito baixos de metilação é interpretada como um efeito epigenético relevante do RET, biologicamente associado à instabilidade genômica e à carcinogênese, reforçando seu potencial toxicológico além da genotoxicidade já descrita.

Além da metilação direta, as enzimas responsáveis por esse evento epigenético também foram mensuradas. Nenhuma das enzimas avaliadas (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3) apresentou alteração estatisticamente significativa em 24h ou 72h, apesar de tendências: as DNMTs mostraram LFC negativo em 24h e positivo em 72h (exceto DNMT3B, que permaneceu negativa); as TETs seguiram padrão semelhante, com repressão em 24h revertendo para LFC positivo em 72h. Como a expressão gênica não explicou diretamente a hipometilação observada, mecanismos pós-transcricionais/pós-traducionais podem ser a explicação mais provável para este efeito, como modificações das próprias DNMTs (fosforilação que compromete sua interação com PCNA/UHRF1), regulação por miRNAs (miR-29s, miR-143, entre outros) e bloqueio físico das DNMTs por lesões oxidativas no DNA (Lyko, 2018; Yin, 2017), mecanismo especialmente relevante dado que o RET já é conhecido por induzir estresse oxidativo (Peixoto et al., 2019; Scaramboni et al., 2023). Para as TETs, a via de desmetilação ativa com diluição passiva (AM-PD) pode explicar a hipometilação mesmo sem grande variação transcricional, já que pequenas modulações da atividade enzimática bastam para impactar o metiloma, hipótese reforçada pela maior hipometilação observada na A549, linhagem de proliferação mais rápida, na qual a diluição replicativa seria potencializada.

Conclusão

A hipometilação global do DNA é reconhecida como um evento epigenético associado à instabilidade genômica, à reativação de elementos transponíveis e à progressão de processos carcinogênicos. Nesse sentido, os achados do presente trabalho são capazes de ampliar o conhecimento sobre o possível potencial tóxico do RET, apontando para um mecanismo de ação epigenético que extrapolam sua genotoxicidade já documentada, e reforçam a relevância desse composto como um agente de risco à saúde pulmonar em cenários de exposição ambiental, especialmente em regiões sujeitas à queima de biomassa. Dessa forma, conclui-se que:

- A viabilidade celular se manteve acima de 70% em todas as concentrações, tempos de exposição e ambas as linhagens celulares testadas, demonstrando que o RET não possui caráter citotóxico;
- O RET induziu hipometilação do DNA em ambas as linhagens celulares, independentemente da concentração utilizada ou do tempo de exposição;
- A análise da expressão diferencial das enzimas DNMTs e TETs em células BEAS-2B expostas ao RET (32 ng/mL) revelou que nenhuma das isoformas avaliadas apresentou alteração estatisticamente significativa em nenhum dos tempos analisados (24 e 72h);
- Em conjunto, esses achados indicam que a hipometilação global observada pode não decorrer diretamente da supressão transcricional dos genes das DNMTs, ou

superexpressão das TETs, sendo mais provável que mecanismos regulatórios pós-transcricionais ou pós-traducionais, como modificações das próprias enzimas, interferência por miRNAs e bloqueio físico das DNMTs por lesões oxidativas no DNA, sejam os principais mediadores do efeito hipometilante do RET. A participação funcional das TETs, possivelmente operando pela via de modificação ativa com diluição passiva (AM-PD), dado que pequenas modulações de sua atividade são suficientes para impactar o metiloma de forma detectável.

Referências

ABOELELLA, Nada S. et al. Oxidative stress in the tumor microenvironment and its relevance to cancer immunotherapy. Cancers, v. 13, n. 5, p. 986, 2021.

AFTHAB, Muhammed et al. Particulate matter-induced epigenetic modifications and lung complications. European Respiratory Review, v. 33, n. 174, 2024.

ALLIS, C. David; JENUWEIN, Thomas. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nature reviews genetics, v. 17, n. 8, p. 487-500, 2016.

ARSHAD, Kashaf et al. Air pollution and climate change as grand challenges to sustainability. Science of The Total Environment, v. 928, p. 172370, 2024.

BAIRD, William M.; HOOVEN, Louisa A.; MAHADEVAN, Brinda. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. Environmental and molecular mutagenesis, v. 45, n. 2-3, p. 106-114, 2005.

BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell research, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.

BAUER, Alison K. et al. The carcinogenic properties of overlooked yet prevalent polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung epithelial cells. Toxics, v. 10, n. 1, p. 28, 2022.

BHATTI, Saurabh et al. Bioaccumulation, biotransformation and toxic effect of fipronil in Escherichia coli. Chemosphere, v. 231, p. 207-215, 2019.

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological), v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995. .

BESSELINK, Nicolle et al. The genome-wide mutational consequences of DNA hypomethylation. Scientific reports, v. 13, n. 1, p. 6874, 2023.

BUKOWSKA, Bożena; SICIŃSKA, Paulina. Influence of benzo (a) pyrene on different epigenetic processes. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 24, p. 13453, 2021.

BURLESON, J. D. et al. TET1 contributes to allergic airway inflammation and regulates interferon and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways in bronchial epithelial cells. Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 7361, 2019.

CAVALLI, Giacomo; HEARD, Edith. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. Nature, v. 571, n. 7766, p. 489-499, 2019.

CHEN, Rui et al. Beyond PM2. 5: The role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, v. 1860, n. 12, p. 2844-2855, 2016.

COHEN, Aaron J. et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. The lancet, v. 389, n. 10082, p. 1907-1918, 2017.

DA SILVA JUNIOR, Francisco Carlos et al. Genotoxicity and behavioral alterations induced by retene in adult zebrafish. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 9, n. 6, p. 106518, 2021.

DA SILVA JUNIOR, Francisco Carlos et al. Unveiling the molecular responses of human lung cells to retene: Transcriptomics insights and implications for toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology, p. 104828, 2025.

DAS, Durgesh Nandini; RAVI, Nathan. Influences of polycyclic aromatic hydrocarbon on the epigenome toxicity and its applicability in human health risk assessment. Environmental research, v. 213, p. 113677, 2022.

DE BRITO, Paulo Henrique Ferreira; DOS SANTOS ARAÚJO, Rinaldo; MARINHO, Glória. Composição química do material particulado atmosférico: uma revisão de literatura. Holos, v. 4, p. 62-74, 2018.

DE OLIVEIRA ALVES, Nilmara et al. Biomass burning in the Amazon region causes DNA damage and cell death in human lung cells. Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 10937, 2017.

DE OLIVEIRA ALVES, Nilmara et al. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, n. 5, p. 1427-1433, 2011.

DE OLIVEIRA GALVÃO, Marcos Felipe et al. Genotoxicity and DNA damage signaling in response to complex mixtures of PAHs in biomass burning particulate matter from cashew nut roasting. Environmental pollution, v. 256, p. 113381, 2020.

DRWAL, Eliza et al. Cell-specific and dose-dependent effects of PAHs on proliferation, cell cycle, and apoptosis protein expression and hormone secretion by placental cell lines. Toxicology Letters, v. 280, p. 10-19, 2017.

DUCA, Radu-Corneliu et al. Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Leads to Non-monotonic Modulation of DNA and RNA (hydroxy) methylation in a Rat Model. Scientific reports, v. 8, n. 1, p. 10577, 2018.

Ensembl genome browser 115. [s.d.]. Ensembl.org. Retrieved May 27, 2026, from https://www.ensembl.org/index.html.

FAN, Yu et al. Tet1 deficiency exacerbates oxidative stress in acute kidney injury by regulating superoxide dismutase. Theranostics, v. 13, n. 15, p. 5348, 2023.

FENECH, Michael et al. Objectives and achievements of the HUMN project on its 26th anniversary. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, v. 794, p. 108511, 2024.

FERNANDEZ, Michael; MIRANDA-SAAVEDRA, Diego. Genome-wide enhancer prediction from epigenetic signatures using genetic algorithm-optimized support vector machines. Nucleic acids research, v. 40, n. 10, p. e77-e77, 2012.

FITZ-JAMES, Maximilian H.; CAVALLI, Giacomo. Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. Nature Reviews Genetics, v. 23, n. 6, p. 325-341, 2022.

FRANCO, Rodrigo et al. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. Cancer letters, v. 266, n. 1, p. 6-11, 2008.

Ggplot2. [s.d.]. Org. Retrieved May 27, 2026, from https://ggplot2.tidyverse.org.

GU, Wen et al. Particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and metals, DNA methylation and DNA methyltransferase among middle-school students in China. Science of The Total Environment, v. 926, p. 172087, 2024.

HAN, Xiaoyan et al. Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. Plos one, v. 15, n. 1, p. e0227174, 2020.

HOLOCH, Daniel; MOAZED, Danesh. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. Nature Reviews Genetics, v. 16, n. 2, p. 71-84, 2015.

HOTCHKISS, Rollin D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. Journal of Biological Chemistry, v. 175, n. 1, p. 315-332, 1948.

HSIAO, WL Wendy et al. Cytotoxicity of PM2. 5 and PM2. 5–10 ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 471, n. 1-2, p. 45-55, 2000.

HUANG, Haiyan et al. Role of poly (ADP-ribose) glycohydrolase silencing in DNA hypomethylation induced by benzo (a) pyrene. Biochemical and biophysical research communications, v. 452, n. 3, p. 708-714, 2014.

IDOWU, Oluyoye et al. Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. Environment international, v. 123, p. 543-557, 2019.

International Agency for Research on Cancer. IARC: outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. lyon: IARC, 2013. (press release, n.

221).disponível em: https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr221_e.pdf. acesso em: 01 maio 2026.

International Agency for Research on Cancer. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon: IARC, 2010. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 92). Disponível em: https://surl.li/mmsing. Acesso em: 11 maio 2026.

ITO, Shinsuke et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. Science, v. 333, n. 6047, p. 1300-1303, 2011.

KALTSAS, Aris et al. Oxidative-stress-mediated epigenetic dysregulation in spermatogenesis: implications for male infertility and offspring health. Genes, v. 16, n. 1, p. 93, 2025.

KE, Shaorui et al. An in vitro cytotoxicities comparison of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human pulmonary alveolar epithelial cells HPAEpiC. Toxicology letters, v. 290, p. 10-18, 2018.

CÓDIGO: SB0101

AUTOR: MARIA LETICIA DA COSTA

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Efeito do tratamento crônico com oximetazolina sobre a memória e aprendizado de camundongos

Resumo

Os adrenoceptores α1A (α1A-AR) participam da modulação da neurotransmissão no sistema nervoso central e são potenciais alvos terapêuticos para distúrbios cognitivos. Todavia, ainda são escassos os estudos farmacológicos que investigam sua participação na aprendizagem e memória. O presente projeto teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento crônico com o agonista parcial dos α1A-AR oximetazolina sobre a memória de reconhecimento de objetos em camundongos. Durante a execução do projeto, resultados do grupo monstraram que a administração aguda de oximetazolina não alterou significativamente a memória de reconhecimento, indicando efeito farmacológico limitado nas condições avaliadas. Achados motivaram o redirecionamento da investigação para a cirazolina, um agonista pleno dos α1A-AR visando avaliar melhor a participação desse receptor na cognição. Os experimentos com a cirazolina evidenciaram a participação dos α1A-AR na consolidação da memória de reconhecimento de longa duração, resultando na elaboração do manuscrito Evidence for α1-adrenoceptor involvement in long-term recognition memory consolidation in mice, atualmente disponibilizado como preprint e em preparação para submissão ao periódico Behavioural Brain Research. Embora o tratamento crônico com oximetazolina permaneça como perspectiva futura, o projeto ampliou a compreensão do papel dos α1A-AR na cognição, consolidou uma nova linha de investigação no grupo de pesquisa e resultou em produção científica relevante.

Palavras-chave: adrenoceptores alfa1A-AR; oximetazolina; memória de reconhecimento;

TITLE: Effect of chronic oxymetazoline treatment on memory and learning in mice

Abstract

α1A - adrenoceptors (α1A-AR) participate in the modulation of neurotransmission within the central nervous system and represent potential therapeutic targets for cognitive disorders. However, pharmacological studies investigating their role in learning and memory remain scarce. This project aimed to evaluate the effects of treatment with oxymetazoline a partial α1A-AR agonist on object recognition memory

in mice. Results showed that acute administration of oxymetazoline did not significantly alter recognition memory, indicating a limited pharmacological effect under the conditions tested. These findings prompted a shift in the investigation toward cirazoline, a full α1A-AR agonist, to better assess the receptor's role in cognition. Experiments with cirazoline demonstrated the involvement of α1A-ARs in the consolidation of long-term recognition memory; this led to the preparation of a manuscript titled "Evidence for α1-adrenergic receptor involvement in long-term recognition memory consolidation in mice," which is currently available as a preprint and being prepared for submission to the journal *Behavioral Brain Research*. Although experimental treatment with oxymetazoline remains a prospect for future study, the project has broadened the understanding of the role of 1αA-AR in cognition, establishing a new line of research within the group that is reflected in significant scientific output.

Keywords: α1A-adrenoceptors; oxymetazoline; recognition memory; mice.

Introdução

Embora haja evidências indicando que a noradrenalina desempenha um papel importante em diversos processos cognitivos no cérebro, a participação dos receptores adrenérgicos α1 (α1- AR) nos mecanismos de aprendizagem e memória ainda é muito estudada, sendo sobretudo investigada por meio de modelos animais geneticamente modificados. Estudos sugerem que a estimulação dos α1-AR pode favorecer ou prejudicar esses processos (Sirviö & MacDonald, 1999). Essa divergência decorre, ao menos em parte, das funções específicas e diferenciadas dos subtipos α1A, α1B e α1D. Pesquisas demonstram que camundongos geneticamente modificados para expressar uma versão constitutivamente ativa do α1A-AR apresentam melhora na aprendizagem, memória e plasticidade sináptica. Todavia, animais knockout para o α1A-AR exibem comprometimento cognitivo, o que reforça a hipótese de que a ativação sustentada desses receptores pode beneficiar a função cognitiva (Doze et al., 2011; Perez, 2020a, 2023; Perez & Doze, 2011). Considerando que o α1A-AR é o subtipo predominante no sistema nervoso central e a limitada disponibilidade de estudos que utilizem abordagens farmacológicas que avalie sua função é escassa, nosso grupo de pesquisa investigou os efeitos da tansulosina. Esse fármaco, antagonista seletivo dos α1A-AR e utilizado no tratamento da hiperplasia prostática benigna, foi analisado quanto à sua ação sobre a memória de reconhecimento de objetos em camundongos. Nossos dados indicaram que a administração aguda de tansulosina por via oral, nas doses de 0,001 e 0,01 mg/kg, comprometeu negativamente as fases de aquisição, consolidação e evocação dessa memória (Holanda et al., 2024). No entanto, ainda são carentes as investigações que utilizam agonistas seletivos dos α1A-AR para avaliar sua influência sobre a aprendizagem e memória, bem como os mecanismos envolvidos. A condução de tais estudos é essencial, pois, caso seja confirmada uma ação pró-cognitiva, esses fármacos poderiam representar uma estratégia terapêutica promissora para condições como a demência senil e a doença de Alzheimer. Os agonistas dos α1-AR formam um grupo farmacológico utilizado no tratamento de diversos distúrbios, como choque vasodilatador, hipotensão, parada cardiorrespiratória, além de condições mais leves, como a congestão nasal. Entre os agonistas com aplicação clínica estão a noradrenalina, adrenalina, fenilefrina, metoxamina e oximetazolina (II & Reddivari, 2023). Dentre esses, a oximetazolina se destaca por ser um agonista parcial com seletividade pelo subtipo α1A-AR (Haenisch et al., 2010; Hone et al., 1995), sendo indicada sobretudo

para o alívio da congestão nasal, rosácea com eritema facial e alergias oculares. Há relatos de efeitos adversos no sistema nervoso central após o uso intranasal, incluindo ansiedade, insônia e convulsões, sugerindo que a oximetazolina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Dokuyucu et al., 2015). Dados recentes obtidos por nosso grupo demonstraram que a administração aguda de oximetazolina não altera o desempenho de camundongos na Tarefa de Reconhecimento de Objetos, indicando ausência de comprometimento da memória de reconhecimento em exposição de curto prazo (Carvalho et al., 2026). Entretanto, os efeitos da administração crônica desse agonista α1A-AR sobre processos cognitivos ainda permanecem desconhecidos. Considerando que a ativação sustentada de receptores adrenérgicos pode desencadear mecanismos adaptativos, como dessensibilização, internalização de receptores e alterações em vias de sinalização intracelular (Maaliki et al., 2024), é plausível que a exposição prolongada à oximetazolina produza efeitos distintos daqueles observados após administração aguda. Destarte, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento crônico com oximetazolina sobre a memória de reconhecimento em camundongos, buscando determinar se a ativação prolongada dos α1A-AR é capaz de modular o desempenho cognitivo desses animais.

Metodologia

Fármacos e tratamentos: A oximetazolina será administrada por via oral (gavagem) durante 60 dias nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 mg/kg. Após o fim do tratamento, os animais serão submetidos aos testes comportamentais. Teste comportamental: reconhecimento de objetos: Para avaliar a memória de reconhecimento e aprendizagem contextual, atemporal e espacial, foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos, conforme descrito previamente por Leger et al. (2013). O teste de reconhecimento de objetos foi conduzido em campo aberto (40 x 40 x 40 cm). Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação onde foi autorizada a exploração livre do campo por 30 minutos. Vinte e quatro horas após a habituação, a sessão de treino foi realizada. Os animais foram colocados no centro do campo aberto por 5 minutos, no qual dois objetos idênticos em forma, tamanho, cor e textura foram posicionados em dois vértices adjacentes, 10 centímetros a partir das paredes. Os animais exploraram o campo aberto, na presença destes dois objetos, e o tempo gasto explorando cada um foi avaliado. Após 24 h ocorreu a sessão teste. Os animais foram novamente submetidos ao campo aberto, mas agora eles foram expostos a dois objetos diferentes: um familiar (o mesmo do dia anterior) e um novo (diferente apenas na forma). O comportamento de exploração foi definido através de parâmetros comportamentais como sniffing, ou tocar o objeto com o focinho e/ou com as patas dianteiras. Um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal na sessão treinamento e na sessão teste, baseando-se nas seguintes proporções: TA2/(TA1+TA2) e TB/(TA1+TB), respectivamente. (TA1 = tempo gasto explorando o objeto familiar A1; TA2 = tempo gasto explorando o objeto familiar A2; TB = tempo gasto explorando o objeto novo B).

Resultados e Discussões

Os experimentos propostos para avaliar os efeitos do tratamento crônico com oximetazolina sobre a memória de reconhecimento em camundongos não foram

realizados durante o período de vigência deste projeto. Inicialmente, estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que a administração aguda de oximetazolina não alterou o desempenho dos animais na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (Carvalho et al., 2026). Esses resultados indicaram que esse agonista parcial dos α1A-AR apresentava efeito limitado sobre os parâmetros cognitivos avaliados. Com base nesses achados, optou-se por redirecionar a investigação para a cirazolina, um agonista pleno dos α1A-AR, com o objetivo de aumentar a probabilidade de identificar os efeitos da ativação farmacológica desse subtipo receptor sobre a memória. Os experimentos realizados com a cirazolina produziram resultados promissores, demonstrando participação dos α1A-AR na consolidação da memória de reconhecimento de longa duração. Esses resultados originaram o manuscrito Evidence for α1-adrenoceptor involvement in long-term recognition memory consolidation in mice (Carvalho et al., 2026), do qual sou coautora, atualmente disponibilizado como preprint e em revisão pelo periódico Behavioural Brain Research. Os resultados completos podem ser acessados no link: https://ssrn.com/abstract=7181899 ou http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.7181899. Embora os experimentos envolvendo o tratamento crônico com oximetazolina não tenham sido concluídos, a hipótese permanece relevante. Os resultados obtidos com agonistas dos α1A-AR reforçam a importância dessa linha de investigação e justificam a realização futura desses estudos, os quais permitirão determinar se a estimulação prolongada dos receptores α1A produz adaptações capazes de modificar o desempenho cognitivo. DISCUSSÃO Os resultados obtidos pelo nosso grupo indicam que a administração aguda de oximetazolina não foi capaz de modificar o desempenho dos animais na tarefa de reconhecimento de objetos (Carvalho et al., 2026). Esse achado sugere que a ativação farmacológica promovida por esse composto não é suficiente para induzir alterações detectáveis na consolidação da memória de reconhecimento nas condições experimentais avaliadas. Embora estudos genéticos tenham demonstrado que a ativação sustentada dos α1A-AR está associada à melhora da plasticidade sináptica e do desempenho cognitivo (Perez & Doze, 2011; Perez, 2020a, 2023), os presentes resultados indicam que a reprodução farmacológica desses efeitos pode depender das propriedades intrínsecas do agonista utilizado. Uma possível explicação para a ausência de efeito da oximetazolina reside em seu perfil farmacológico. Apesar de apresentar seletividade pelos α1A-AR, esse fármaco também possui afinidade significativa pelos adrenoceptores α2A (α2A-AR) (Tobias, Cartabuke & Taghon, 2014). A ativação dos α2A-AR reduz a liberação de noradrenalina em diversas regiões encefálicas, podendo limitar a intensidade da neurotransmissão noradrenérgica necessária para a modulação dos processos de aprendizagem e memória. Adicionalmente, os efeitos cognitivos associados à estimulação dos α2A-AR parecem estar mais relacionados à memória de trabalho e ao controle atencional (Arnsten, 2011) do que à memória episódica de longa duração avaliada neste estudo. Outro aspecto relevante é que a oximetazolina atua como agonista parcial dos α1A-AR. Em sistemas biológicos complexos, agonistas parciais podem produzir respostas limitadas mesmo quando ocupam elevada proporção dos receptores disponíveis (Haenisch et al., 2010; Hone et al., 1995). Dessa forma, é possível que a intensidade da ativação promovida pela oximetazolina no tratamento agudo não tenha sido suficiente para desencadear as cascatas de sinalização intracelular associadas à facilitação dos processos de consolidação mnemônica descritos para esse subtipo receptor. Essa interpretação é reforçada pelos resultados subsequentes obtidos com a cirazolina, um agonista pleno dos α1A-AR. Diferentemente da oximetazolina, a administração de cirazolina de forma aguda produziu evidências de envolvimento dos α1-AR na consolidação da memória de reconhecimento de longa duração, corroborando a hipótese de que a ativação desses receptores desempenha papel relevante nos

mecanismos cognitivos (Carvalho et al., 2016). Em conjunto, esses achados sugerem que não apenas a ativação dos α1A-AR, mas também a eficácia intrínseca do agonista e seu perfil de seletividade farmacológica, constituem fatores determinantes para a modulação da memória. Portanto, a ausência de efeito observada com a oximetazolina no tratamento agudo não necessariamente contradiz a participação dos receptores α1A-adrenérgicos na cognição. Ao contrário, os resultados apontam para uma relação mais complexa entre ativação receptor-específica e desempenho cognitivo, reforçando a necessidade de estudos adicionais que comparem agonistas com diferentes perfis farmacodinâmicos e investiguem os efeitos da estimulação prolongada desses receptores sobre a memória e a plasticidade neural.

Conclusão

Embora os experimentos inicialmente propostos para avaliar os efeitos do tratamento crônico com a oximetazolina sobre a memória de reconhecimento não tenham sido realizados durante a vigência deste projeto, os resultados obtidos ao longo de sua execução permitiram o redirecionamento da estratégia experimental e contribuíram para o avanço do conhecimento sobre o papel dos α1A-AR nos processos cognitivos. A ausência de alterações comportamentais após a administração aguda de oximetazolina motivou a investigação de um agonista pleno dos α1A-AR, a cirazolina, cujos resultados forneceram evidências da participação desses receptores na consolidação da memória de reconhecimento de longa duração. Esses achados culminaram na elaboração do manuscrito Evidence for α1-adrenoceptor involvement in long-term recognition memory consolidation in mice, atualmente disponibilizado como preprint e em revisão pelo periódico Behavioural Brain Research, demonstrando que o projeto gerou produção científica e estabeleceu bases sólidas para a continuidade desta linha de pesquisa. Estudos futuros deverão investigar se a ativação prolongada dos α1A-AR por agonistas seletivos é capaz de promover alterações duradouras na aprendizagem e na memória, contribuindo para a compreensão do potencial terapêutico dessa via em distúrbios cognitivos.

Referências

Carvalho, Yanka do Vale and Sena, Maele Oliveira de and Chaves, Herick Jose Cunha and Costa, Maria Letícia da and Rocha, Anna Karynna Alves de Alencar and Gavioli, Elaine Cristina and Silva Junior, Edilson Dantas, Evidence for α1-adrenoceptor involvement in long- term recognition memory consolidation in mice. Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=7181899 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.7181899 Dokuyucu, R., Gokce, H., Sahan, M., Sefil, F., Tas, Z. A., Tutuk, O., Ozturk, A., Tumer, C., & Cevik, C. (2015). Systemic side effects of locally used oxymetazoline. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(2), 2674. /pmc/articles/PMC4402865/ Doze, V. A., Papay, R. S., Goldenstein, B. L., Gupta, M. K., Collette, K. M., Nelson, B. W., Lyons, M. J., Davis, B. A., Luger, E. J., Wood, S. G., Haselton, J. R., Simpson, P. C., & Perez, D. M. (2011). Long-term α1A-adrenergic receptor stimulation improves synaptic plasticity, cognitive function, mood, and longevity. Molecular Pharmacology, 80(4), 747–758. https://doi.org/10.1124/MOL.111.073734 Haenisch, B., Walstab, J., Herberhold, S.,

Bootz, F., Tschaikin, M., Ramseger, R., & Bönisch, H. (2010). Alpha-adrenoceptor agonistic activity of oxymetazoline and xylometazoline. Fundamental & Clinical Pharmacology, 24(6), 729–739. https://doi.org/10.1111/J.1472- 8206.2009.00805.X Holanda VAD, Oliveira MC, de Oliveira Torres CI, de Almeida Moura C, Belchior H, da Silva Junior ED, Gavioli EC. The alpha 1A antagonist tamsulosin impairs memory acquisition, consolidation and retrieval in a novel object recognition task in mice. Behav Brain Res. 2024 Jul 9;469:115027. doi: 10.1016/j.bbr.2024.115027. Hone, K., Obika, K., Foglar, R., & Tsujimoto, G. (1995). Selectivity of the imidazoline alpha-adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned alpha 1-adrenoceptor subtypes. British Journal of Pharmacology, 116(1), 1611–1618. https://doi.org/10.1111/J.1476- 5381.1995.TB16381.X II, J. S. D., & Reddivari, A. K. R. (2023). Alpha-1 Receptor Agonists. StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551698/ Maaliki D, Jaffa AA, Nasser S, Sahebkar A, Eid AH. Adrenoceptor Desensitization: Current Understanding of Mechanisms. Pharmacol Rev. 2024 May 2;76(3):358-387. doi: 10.1124/pharmrev.123.000831. Perez, D. M. (2020a). α1-Adrenergic Receptors in Neurotransmission, Synaptic Plasticity, and Cognition. Frontiers in Pharmacology, 11, 1563. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.581098/BIBTEX Perez, D. M. (2020b). α1-Adrenergic Receptors in Neurotransmission, Synaptic Plasticity, and Cognition. Frontiers in Pharmacology, 11, 581098. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.581098/BIBTEX Perez, D. M. (2023). α1-Adrenergic Receptors: Insights into Potential Therapeutic Opportunities for COVID-19, Heart Failure, and Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 4188, 24(4), 4188. https://doi.org/10.3390/IJMS24044188 Perez, D. M., & Doze, V. A. (2011). Cardiac and neuroprotection regulated by α(1)-adrenergic receptor subtypes. Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 31(2), 98–110. https://doi.org/10.3109/10799893.2010.550008 Sirviö, J., & MacDonald, E. (1999). Central alpha1-adrenoceptors: their role in the modulation of attention and memory formation. Pharmacology & Therapeutics, 83(1), 49–65. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00017-0 Wilson, D. A.; Stervenson, R. J. The role of the acetylcholinergic system in learning and memory. In: The Wiley Handbook on the Cognitive Neuroscience of Learning. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2015. p. 145-166. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2659740/. Tobias, Joseph D.; Cartabuke, Richard; Taghon, Thomas. Oxymetazoline (Afrin®): maybe there is more that we need to know. Paediatric anaesthesia, v. 24, n. 8, p. 795–798, 2014. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25039870/.

CÓDIGO: SB0113

AUTOR: WILLIAN ALISSON ALVES DA SILVA

COAUTOR: MERY INGRID GUIMARÃES DE ALENCAR

ORIENTADOR: ADRIANO CALIMAN FERREIRA DA SILVA

TÍTULO: Efeitos interativos da qualidade do detrito e condições microclimáticas na decomposição da matéria orgânica

Resumo

A decomposição é um processo ecológico essencial na natureza, e desempenha um papel importante na ciclagem e estoque de nutrientes nos ecossistemas, que são reutilizados por diversos organismos. A diversidade na composição de espécies é um dos fatores que controlam essa decomposição, entretanto, não se sabe muito sobre os efeitos da diversidade intraespecífica para a decomposição de detritos foliares. Frutos ao amadurecerem, se juntam à liteira juntamente com as folhas mortas, e esses órgãos reprodutivos têm a presença de muitos açúcares e água, mudando a composição química e física da liteira. Nesse estudo, buscamos entender melhor o funcionamento e o impacto no uso de detritos de frutos na decomposição de detritos foliares dentro da mesma espécie para várias espécies diferentes. No estudo foi usado detrito foliar e detrito de fruta de cinco espécies de árvores frutíferas de fruto carnoso (Mangifera indica, Anacardium occidentale, Psidium guajava, Persea americana e Annona muricata) e simulado a decomposição desses detritos durante 4 meses em laboratório para ser testado a taxa de decomposição de cada detrito foliar em concentrações diferentes de fruto.

Palavras-chave: biodiversidade e funcionamento de ecossistemas. qualidade de detrito.

TITLE: Fruit-Leaf Interactions in Decomposition: How Fruit Detritus Influences Leaf Litter Decomposition in Tropical Fruit-Bearing Trees

Abstract

Decomposition is an essential ecological process in nature and plays an important role in the cycling and storage of nutrients in ecosystems, which are reused by various organisms. Diversity in species composition is one of the factors controlling this decomposition; however, little is known about the effects of intraspecific diversity on leaf litter decomposition. As fruits ripen, they join the litter along with dead leaves, and

these reproductive organs contain many sugars and water, altering the chemical and physical composition of the litter. In this study, we sought to better understand how fruit litter functions and its impact on leaf litter decomposition within the same species across several different species. The study used leaf litter and fruit litter from five species of fleshy fruit trees (Mangifera indica, Anacardium occidentale, Psidium guajava, Persea americana and Annona muricata) and simulated the decomposition of these litter for 4 months in the laboratory to test the decomposition rate of each leaf litter in different fruit concentrations.

Keywords: biodiversity and ecosystem functioning. litter quality.

Introdução

A decomposição é um serviço ecossistêmico muito importante nos ambientes terrestres e aquáticos, devido ao seu papel na regulação da dinâmica de ciclagem de nutrientes, transformação do carbono e fluxo de matéria (Cebrian and Lartigue, 2004). Isso porque grande parte da matéria orgânica produzida, cerca de 90%, irá se tornar detrito e vai compor o estoque de nutrientes do ecossistema. Os principais fatores regulando a decomposição nos ecossistemas são fatores abióticos, como temperatura, clima e umidade, e fatores bióticos, como diversidade e abundância de decompositores e qualidade do detrito (Trogisch et al., 2016; Makkonen et al., 2012)

A diversidade de detritos é um importante aspecto mediando a ciclagem de nutrientes e as taxas de decomposição nos ecossistemas (Hättenschwiler, 2005), pois em ambientes naturais, detritos com diferentes constituições químicas interagem resultando em efeitos não-aditivos, que podem aumentar ou diminuir a decomposição (Liu et al., 2020; Porre et al., 2020). O aumento da decomposição em mistura comparado à monocultura é denominado de efeitos sinérgicos e a diminuição da decomposição comparada às suas monoculturas de efeitos antagônicos. Estudos indicam que há ocorrência de efeitos sinérgicos na decomposição a nível global (Liu et al. 2020), mas esses efeitos ainda são avaliados considerando principalmente detritos foliares, por representar a maior biomassa na serrapilheira, com cerca de 90% (Cebrian, 1999). Os efeitos não-aditivos podem ser mais fortes e determinantes do que fatores abióticos para a decomposição nos ecossistemas (Makkonen et al., 2012; García-Palacios et al., 2016). E os principais mecanismos explicando os efeitos não-aditivos estão associados à dissimilaridade funcional entre os detritos, que consiste na diferença de concentração de compostos estruturais, como o carbono (C) e lignina, e nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P) entre os detritos (Lecerf et al., 2011). Detritos lábeis, com menor razão C:nutrientes, possuem uma maior taxa de decomposição, enquanto detritos refratários possuem maior razão C:nutrientes e apresentam menor taxa de decomposição. De maneira geral, efeitos sinérgicos são associados a mecanismos como priming effect ou transferência de nutrientes, onde o detrito lábil aumenta a decomposição do detrito refratário, aliviando a limitação de nutrientes para os decompositores (Guenet et al., 2010; Handa et al., 2014), Já os efeitos antagônicos estão associados a efeitos inibitórios ou efeito de diluição dos detritos refratários sobre os detritos lábeis nos quais a presença de compostos secundários como taninos e polifenóis dificulta a decomposição ao proteger compostos lábeis (Butenschoen et al. 2014) e a maior concentração de compostos refratários pode dificultar a decomposição ao diluir a concentração relativa de compostos lábeis (Grossman et al. 2020).

Estudos recentes mostraram que a diversidade interespecífica não é a única importante para controlar a decomposição, mas que a diversidade intraespecífica também tem um papel muito relevante. A mistura de órgãos reprodutivos como as flores que são ricas em em nutrientes e carbono lábil (Stamp, 2003) e detritos foliares vão ter um efeito sinérgico muito positivo para a decomposição (Alencar et al. 2024), assim como a mistura de frutos e detritos foliares (de Paz, 2018). A fruta é uma estrutura da planta que quando amadurece, compõe a serrapilheira ao cair no chão juntamente com o detrito foliar. Essa estrutura tem uma razão estequiométrica baixa e é composta por altos níveis de açúcares, sendo considerada um detrito lábil e com alto potencial para a aceleração da decomposição de detritos foliares refratários, trazendo umidade para o microambiente e estimulando a atividade microbiana (Damascos et al. 2008; e.g.,Wardle et al. 2002; Ohm et al. 2007), podendo ser um fator muito importante em ambientes secos devido a sua capacidade de fornecer água para o microambiente (de Paz, 2018).

Metodologia

Coleta de detritos e delineamento amostral

Para conduzir esse experimento, foram escolhidas cinco espécies de árvores frutíferas com fruto carnoso com bastante polpa, consistindo na camada intermediária (mesocarpo) do fruto com textura macia e suculenta, e a camada interna (endocarpo) do fruto que engloba e protege a semente com objetivo de atrair dispersores. características : MangiferaindicaL., AnacardiumoccidentaleL., PsidiumguajavaL., PerseaamericanaMill.,AnnonamuricataL. Para a realização do experimento, foram coletados 200 g de detrito foliar de cada espécie, selecionando apenas folhas sem danos e que caíram recentemente na serrapilheira. Após a coleta, os detritos foliares foram colocados para secar na estufa a 45 °C por sete dias até o peso constante. Após a secagem, as folhas foram armazenadas em local escuro e seco para evitar a degradação até o início do experimento. Com os frutos foi utilizada outra abordagem, em função da sua baixa disponibilidade de frutos em ambiente natural para algumas das espécies selecionadas; todos os frutos foram comprados a fim de manter uma padronização. Os frutos comercializados têm um critério de qualidade, então preferimos comprar para todas as espécies e evitar uma variação nos resultados observados associada à origem do fruto, ambiente natural ou comercializado caso fossem usadas frutos colhidas em ambiente natural para algumas espécies e comercializadas para outras. Assim, todos os frutos do experimento foram comprados em supermercados e feiras poucos dias antes do experimento, sendo selecionados aqueles que não apresentavam muitos danos e que estavam em um grau de amadurecimento elevado, com a casca da fruta apresentando uma coloração amarelada ou avermelhada e menos rigidez e com aroma forte. Após a compra, os frutos foram armazenados em local seco dentro de uma caixa de isopor para proteção e manutenção da temperatura e para acelerar o processo de amadurecimento até o uso dos mesmos no experimento.

Local do experimento

Para avaliar a decomposição dos detritos, foram utilizados microcosmos feitos de cilindros de plástico com 15 cm de diâmetro e 10 cm de altura, com aberturas de 0,5 cm

tanto nas laterais quanto no fundo dos cilindros para evitar o acúmulo de água dentro dos microcosmos (Handa et al., 2014). Cada microcosmo foi preenchido com uma camada de aproximadamente 3 cm de solo coletada de um fragmento de restinga da Mata Atlântica (5°50'33.9"S 35°12'04.5"W). Antes de ser colocado nos microcosmos, o solo foi peneirado em uma malha de 2 mm para remover partículas grandes, em seguida, foi misturado para homogeneizar nutrientes e microrganismos que pudessem influenciar a decomposição. Na montagem dos microcosmos para o início do experimento, primeiro foi colocada uma camada de solo seguida de uma rede de nylon, com abertura de 1 mm, a fim de evitar a perda do detrito foliar e do fruto no solo e superestimar a decomposição no experimento. Essa abertura foi escolhida, pois retém partículas pequenas de detritos enquanto ainda permite a colonização por microrganismos do solo, permitindo que atuem na decomposição. Após a rede de nylon, foram colocados os detritos foliares, posicionados de forma horizontal, seguidos pelos frutos. A ordem de entrada dos detritos foliares e dos frutos segue a fenologia natural. Não foi colocada uma rede de nylon na abertura dos microcosmos para permitir a colonização de moscas da fruta, que auxilia na decomposição dos detritos.

Para entender os efeitos interativos dos detritos a nível intraespecífico, foram usados dois tipos de tratamentos. O primeiro consistiu em apenas detrito foliar de cada espécie analisada (monocultura) e o segundo tratamento consistiu na mistura de detrito foliar e fruto (mistura). A quantidade de detrito foliar foi a mesma em todos os tratamentos, foram utilizadas 3g de detrito foliar. No entanto, para o fruto foram utilizados três níveis de concentração diferentes, classificados como baixa, média e alta, contendo 1 g , 3 g e 5 g de fruto, respectivamente. As concentrações de fruto foram definidas em razão de não termos informações sobre a quantidade média de frutos que compõem a serrapilheira de diferentes espécies de árvores, sendo mais recomendado usar um gradiente de concentração de fruto no lugar de um único valor de concentração, gradiente esse que ocorre na natureza, onde a concentração dos frutos que compõem a serrapilheira é maior próxima à planta e vai diminuindo quanto mais longe da planta (Alencar et al. 2024). Diferentes concentrações também nos permitem avaliar se a ocorrência, direção e magnitude dos efeitos não-aditivos a nível intraespecífico variam em função da quantidade de frutos. Todos os tratamentos, monoculturas e misturas, tiveram 10 réplicas por tratamento, totalizando 200 microcosmos [4 tratamentos (1 monocultura + 3 misturas para cada espécie) x 5 espécies x 10 réplicas]. O experimento teve duração de quatro meses e foi realizado entre março e julho de 2025. Durante o experimento, os microcosmos foram aleatorizados e colocados em bandejas de plástico, com os microcosmos sendo reposicionados aleatoriamente novamente a cada semana até o fim do experimento.

Resultados e Discussões

No geral, observamos efeitos interativos da adição de fruto na decomposição foliar, com a magnitude dos efeitos não-aditivos sendo espécie-específicos (Tabela 1). No geral, a taxa de decomposição foi maior em A. muricata, seguida por P. americana, P. guajava, M. indica e A. occidentale (Figura 1a). Observamos a preponderância de efeitos sinérgicos intraespecíficos em detritos foliares ao interagirem com frutos. Das 15

misturas, nove resultaram em efeitos não-aditivos, sendo oito sinérgicos e um antagônico (Figura 1b). Os efeitos da biomassa de fruto na direção e magnitude dos efeitos não-aditivos no detrito foliar foram bem variáveis. Sendo sinérgicos para as espécies A. muricata, M. indica e A. occidentale, e antagônicos para P. americana. Apenas a espécie P. guajava apresentou efeito aditivo para todos os níveis de biomassa de fruto. Nas espécies A.muricata e A.occidentale, a biomassa do fruto influenciou a magnitude dos efeitos sinérgicos, em que os tratamentos com biomassa de 3 g e 5 g de fruto apresentaram efeitos sinérgicos mais fortes quando comparados ao tratamento de 1 g. E os efeitos sinérgicos foram mais fortes para a A. occidentale. A. occidentale. Já para P. americana a adição de 1g e 3g de fruto teve uma magnitude maior quando comparado a adição de 5g de fruto, onde houve uma redução enorme da decomposição. Para M. indica, a adição de 1g de fruto acarreta em efeitos antagônicos, enquanto a adição de 3g e 5g gerou apenas efeitos aditivos.

No geral, houve uma diferença de concentração de nutrientes presentes nos detritos de folhas e frutos.

As espécies A. muricata, P. americana e M. indica apresentaram maior concentração de N nos detritos de fruto, enquanto P. guajava e A. occidentale apresentaram maior concentração nos detritos foliares (Fig. 2a). Para todas as espécies, a concentração de fósforo e potássio foi maior nos detritos de fruto (Fig. 2b e 2c). O cálcio apresentou maior concentração nos detritos foliares para a maioria das espécies exceto para A. occidentale (Fig. 2d), e o magnésio apresentou maior concentração nos detritos foliares para maioria das espécies exceto para A. muricata que não houve diferença significativa (Fig. 2e).

Conclusão

Esperamos que os resultados ajudem a entendermos melhor o funcionamento das interações intraespecíficas da decomposição, e sua influência no estoque e ciclagem de nutrientes dos ecossistemas.

Referências

Alencar, M. I. G. D., Guariento, R. D., Guenet, B., Carneiro, L. S., Voigt, E. L., and Caliman, A.: “Blooming” of litter-mixing effects: the role of flower and leaf litter interactions on decomposition in terrestrial and aquatic ecosystems, Biogeosciences, 21, 3165–3182, https://doi.org/10.5194/bg-21-3165-2024, 2024.

Cebrian, J. and Lartigue, J.: Patterns of Herbivory and Decomposition in Aquatic and Terrestrial Ecosystems, Ecol. Monogr., 74, 237–259, 2004.

Damascos M, Arribere M, Svriz M, Bran D. Fruit mineral contents of six wild species of the north andean Patagonia, Argentina. Biol Trace Elem Res 125:72–80, 2008.

de Paz, M., Gobbi, M.E. & Raffaele, E. Fallen fruits stimulate decomposition of leaf litter of dominant species in NW Patagonia shrublands. Plant Soil 425, 433–440. https://doi.org/10.1007/s11104-018-3590-0, 2018.

García-Palacios, P., Mckie, B. G., Handa, I. T., Frainer, A., and Hättenschwiler, S.: The importance of litter traits and decomposers for litter decomposition: A comparison of aquatic and terrestrial ecosystems within and across biomes, Funct. Ecol., 30, 819–829, https://doi.org/10.1111/1365-2435.12589, 2016.

Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L., and Lacroix, G.: Priming effect: Bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology, Ecology, 91, 2850–2861, https://doi.org/10.1890/09-1968.1, 2010.

Handa, I. T., Aerts, R., Berendse, F., Berg, M. P., Bruder, A., Butenschoen, O., Chauvet, E., Gessner, M. O., Jabiol, J., Makkonen, M., McKie, B. G., Malmqvist, B., Peeters, E. T. H. M., Scheu, S., Schmid, B., van Ruijven, J., Vos, V. C. A., and Hättenschwiler, S.: Consequences of biodiversity loss for litter decomposition across biomes, Nature, 509, 218–21, https://doi.org/10.1038/nature13247, 2014.

Hättenschwiler, S. and Gasser, P.: Soil animals alter plant litter diversity effects on decomposition, P. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 1519–1524, https://doi.org/10.1073/pnas.0404977102, 2005.

Hättenschwiler, S., Tiunov, A., and Scheu, S.: Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems, Annu. Rev. Ecol. Evol., 36, 191–218, https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932, 2005.

Hättenschwiler S. Effects of tree species diversity on litter quality and decomposition. In Forest Diversity and Function: Temperate and Boreal Systems, ed. M Scherer-Lorenzen, C Körner, E-D Schulze, 176:149–64. Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.

Lecerf, A., Marie, G., Kominoski, J. S., LeRoy, C. J., Bernadet, C., and Swan, C. M.: Incubation time, functional litter diversity, and habitat characteristics predict litter-mixing effects on decomposition, Ecology, 92, 160–169, https://doi.org/10.1890/10-0315.1, 2011.

Liu, J., Liu, X., Song, Q., Compson, Z. G., LeRoy, C. J., Luan, F., Wang, H., Hu, Y., and Yang, Q.: Synergistic effects: a common theme in mixed-species litter decomposition, New Phytol., 227, 757–765, https://doi.org/10.1111/nph.16556, 2020.

Makkonen, M., Berg, M. P., Handa, I. T., H??ttenschwiler, S., van Ruijven, J., van Bodegom, P. M., and Aerts, R.: Highly consistent effects of plant litter identity and functional traits on decomposition across a latitudinal gradient, Ecol. Lett., 15, 1033–1041, https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01826.x, 2012.

Nixon, S.W.. Between Coastal Marshes and Coastal Waters — A Review of Twenty Years of Speculation and Research on the Role of Salt Marshes in Estuarine Productivity and Water Chemistry. In: Hamilton, P., Macdonald, K.B. (eds) Estuarine and Wetland Processes. Marine Science, vol 11. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5177-2_20, 1980.

Ohm H, Hamer U, Marschner B. Priming effects in soil size fractions of a podzolBs horizon after addition of fructose and alanine. J Plant Nutr Soil Sci 17:551–559, 2007.

Porre, R. J., van der Werf, W., De Deyn, G. B., Stomph, T. J., and Hoffland, E.: Is litter decomposition enhanced in species mixtures? A meta-analysis, Soil Biol. Biochem., 145, 107791, https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107791, 2020.

Santos e Silva, C. M., Lúcio, P. S., and Spyrides, M. H. C.: Distribuição espacial da precipitação sobre o Rio Grande do Norte: estimativas via satélites e medidas por pluviômetros, Rev. Bras. Meteorol., 27, 337–346, https://doi.org/10.1590/S0102-77862012000300008, 2012.

Stamp, N.: Out Of The Quagmire Of Plant Defense Hypotheses, Q. Rev. Biol., 78, 23–55, https://doi.org/10.1086/367580, 2003.

Swaine M, Bergna A, Oyserman B, Vasileiadis S, Karas PA, Screpanti C, Karpouzas DG. Impact of pesticides on soil health: identification of key soil microbial indicators for ecotoxicological assessment strategies through meta-analysis. FEMS Microbiol Ecol. May 20;101(6):fiaf052. doi: 10.1093/femsec/fiaf052. Erratum in: FEMS Microbiol Ecol. 2026 Feb 19;102(3):fiag020. doi: 10.1093/femsec/fiag020. PMID: 40338616; PMCID: PMC12105574, 2025.

Trogisch, S., He, J.-S., Hector, A., Scherer-Lorenzen, M.. Impact of species diversity, 646 stand age and environmental factors on leaf litter decomposition in subtropical forests in 647 China. Plant Soil 400, 337–350, 2016.

Twilley, R. W., Lugo, A. E., & Patterson-Zucca, C.. Litter Production and Turnover in Basin Mangrove Forests in Southwest Florida. Ecology, 67(3), 670–683. https://doi.org/10.2307/1937691, 1986.

Wardle DA, Bonner KI, Barker GM. Linkages between plant litter decomposition, litter quality, and vegetation responses to herbivores. Funct Ecol 16:585–595, 2002.

Anexos



Resumo da ANOVA bifatorial para os efeitos individuais e interativos das espécies e da mistura intraespecífica de detritos (folhas + frutos) na perda de massa de detritos foliares. df = graus de liberdade; MS = média dos quadrados.



Figura 1. Efeitos interativos intraespecíficos entre detritos foliares e de fruto. (a) Perda de massa do detrito foliar (% da massa inicial) para cada espécie de árvore frutífera em monocultura e em 3 concentrações de frutos (1 g, 3 g e 5 g). Letras indic



Composição química de detritos foliares e do fruto para cinco espécies com fruto carnoso. Barras indicam média ± desvio padrão.

CÓDIGO: SB0120

AUTOR: VITÓRIA MARIA DE SOUZA

COAUTOR: PEDRO LUCAS VIEIRA ALVES

COAUTOR: ADRIANA FERREIRA UCHOA

COAUTOR: MELISSA FARIAS ALVES DA SILVA

COAUTOR: CYNTHIA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: VANIA SOUSA ANDRADE

TÍTULO: Avaliação da interação in vitro entre antifúngicos e óleos essenciais de Lippia grata e Croton blanchetianus e da atividade antifúngica in vivo em Galleria mellonella infectada por Sporothrix spp.

Resumo

A esporotricose é uma micose de importância clínica que impacta na saúde pública, especialmente pela transmissão zoonótica associada a *Sporothrix brasiliensis* e pelas limitações relacionadas ao tratamento. Nesse contexto, este estudo avaliou a atividade *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de *Lippia grata* Schauer e *Croton blanchetianus* Baill contra isolados de *Sporothrix* spp., investigando sua interação com o itraconazol e a anfotericina B pelo método Checkerboard e sua atividade *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*. As interações foram avaliadas pelo índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) e pelo modelo Zero Interaction Potency (ZIP), que permitiram classificar as combinações como sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. No modelo *in vivo*, foram avaliadas a toxicidade dos óleos e sua atividade terapêutica, considerando sobrevivência, índice de saúde e carga fúngica. Nas associações com os antifúngicos, predominaram interações aditivas, apesar da detecção de sinergismo em algumas cepas. No modelo de *G. mellonella*, ambos os óleos apresentaram baixa toxicidade nas doses avaliadas. Na avaliação terapêutica, apenas o óleo essencial de *Lippia grata* na dose de 20 mg/kg aumentou significativamente a sobrevivência das larvas infectadas. Esses resultados indicam potencial para o uso combinado dos óleos com antifúngicos e contribuem para novos estudos sobre produtos vegetais e seu possível uso futuro no tratamento de micoses.

Palavras-chave: Esporotricose. Antifúngicos. Óleos essenciais. Micoses endêmicas.

TITLE: Evaluation of in vitro interaction between antifungals and essential oils of Lippia grata and Croton blanchetianus and in vivo antifungal activity in Galleria mellonella infected with Sporothrix spp.

Abstract

Sporotrichosis is a clinically significant fungal infection that impacts public health, particularly due to zoonotic transmission associated with *Sporothrix brasiliensis* and limitations related to treatment. In this context, this study evaluated the *in vitro* and *in vivo* activity of essential oils from *Lippia grata* Schauer and *Croton blanchetianus* Baill against isolates of *Sporothrix* spp., investigating their interaction with itraconazole and amphotericin B using the Checkerboard method and their *in vivo* activity in a *Galleria mellonella* model. Interactions were evaluated using the fractional inhibitory concentration (FIC) index and the Zero Interaction Potency (ZIP) model, which allowed the combinations to be classified as synergistic, additive, indifferent, or antagonistic. In the *in vivo* model, the toxicity of the oils and their therapeutic activity were evaluated, considering survival, health index, and fungal load. In combinations with antifungals, additive interactions predominated, despite the detection of synergy in some strains. In the *G. mellonella* model, both oils exhibited low toxicity at the doses evaluated. In the therapeutic evaluation, only the essential oil of *Lippia grata* at a dose of 20 mg/kg significantly increased the survival of infected larvae. These results indicate potential for the combined use of the oils with antifungals and contribute to further studies on plant-based products and their possible future use in the treatment of fungal infections.

Keywords: Sporotrichosis. Antifungals. Essential oils. Endemic mycoses.

Introdução

Nos últimos anos, o aumento das infecções fúngicas e da resistência aos antifúngicos têm sido motivo de preocupação para a Organização Mundial da Saúde (OMS), que destaca essas condições como importantes ameaças à saúde global, em razão de acarretarem uma elevada morbimortalidade e significativos impactos socioeconômicos. Entre essas infecções, a esporotricose, causada por fungos dimórficos do gênero *Sporothrix* e reconhecida pela OMS como uma doença tropical negligenciada, configura-se como a micose subcutânea de maior ocorrência no mundo, particularmente em regiões tropicais e subtropicais. A expansão geográfica dos surtos, o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos e o predomínio da transmissão zoonótica por gatos domésticos contribuíram para que essa micose de implantação se consolidasse como um relevante problema de saúde pública, sobretudo no Brasil e em outros

países da América Latina, onde a espécie *Sporothrix brasiliensis* é responsável pela maior parte dos casos registrados (Hernández-Castro *et al*., 2022; Rodrigues *et al*., 2022; Rosa; Quaresma, 2025). Nesse contexto epidemiológico, a esporotricose foi recentemente incluída na lista de doenças de notificação compulsória no Brasil, visando ampliar a vigilância epidemiológica, reduzir a subnotificação, facilitar o diagnóstico precoce e assegurar um melhor acesso ao tratamento (Brasil, 2024).

No que se refere ao tratamento da maioria das formas clínicas da esporotricose, o itraconazol permanece sendo o antifúngico de primeira escolha, em razão de sua eficácia e segurança. Contudo, relatos de casos refratários ao tratamento têm se tornado cada vez mais frequentes, particularmente em pacientes imunossuprimidos ou com comorbidades, o que demanda o uso de outros fármacos ou de terapias combinadas que costumam ser mais onerosas, menos eficazes ou associadas à maior toxicidade (Orofino-Costa *et al*., 2022; Sharma, B.; Sharma, A.; Sharma, U., 2022). Assim, a investigação de novas substâncias com atividade antifúngica, bem como de estratégias terapêuticas capazes de potencializar a eficácia dos antifúngicos convencionais, tem despertado crescente interesse científico.

Sob essa perspectiva, a biodiversidade brasileira constitui uma fonte significativa de compostos bioativos com potencial farmacológico, uma vez que diversas espécies vegetais presentes nos biomas brasileiros possuem propriedades biológicas já documentadas, incluindo atividades anti-inflamatórias (Froz *et al*., 2024), antioxidantes (Maciel Tomazzoli *et al*., 2024), antiparasitárias (Lima *et al*., 2021), antibacterianas (Araújo *et al*., 2017) e antifúngicas (Soares *et al*., 2026). Entre essas, *Lippia grata* Schauer e *Croton blanchetianus* Baill se destacam, visto que seus óleos essenciais já demonstraram atividade antimicrobiana contra diversos fungos de importância clínica. No entanto, apesar desse potencial, ainda há poucos estudos que investigam a atividade desses óleos contra *Sporothrix* spp., tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, além de sua interação com antifúngicos empregados na prática clínica (Costa *et al*., 2020; Malveira *et al*., 2022; Oliveira *et al*., 2020).

Tendo em vista esses aspectos, este estudo buscou ampliar o conhecimento sobre o potencial antifúngico de produtos naturais frente a isolados de *Sporothrix* spp., podendo contribuir para o desenvolvimento de estratégias que complementam os tratamentos disponíveis, visando melhorar sua eficácia terapêutica e minimizar possíveis efeitos adversos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica, *in vitro* e *in vivo*, dos óleos essenciais de *Lippia grata* Schauer e *Croton blanchetianus* Baill contra isolados de *Sporothrix* spp., por meio da análise da interação entre os óleos essenciais e antifúngicos clínicos pelo método Checkerboard e a investigação da atividade antifúngica *in vivo* utilizando o modelo experimental de *Galleria mellonella*, com a perspectiva de subsidiar novos estudos voltados ao tratamento das micoses.

Metodologia

As etapas experimentais descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEAN), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande

do Norte (UFRN).

Por se tratar de um trabalho vinculado a um projeto de pesquisa já concluído, os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Lippia grata* Schauer (OELg) e *Croton blanchetianus* Baill (OECb), assim como os valores de CIM dos antifúngicos utilizados, já haviam sido determinados anteriormente, de forma que as atividades desenvolvidas neste estudo configuram a continuidade de etapas experimentais já realizadas. Assim, as fases metodológicas foram direcionadas para a avaliação da interação entre os óleos essenciais e os antifúngicos itraconazol e anfotericina B pelo método Checkerboard, além da investigação da atividade antifúngica *in vivo* utilizando o modelo experimental de *Galleria mellonella*, no qual as larvas foram infectadas com amostras de *Sporothrix* spp.

Para tal, foram avaliadas cepas do complexo *Sporothrix* spp., incluindo isolados clínicos de felinos (CEUA-UFG, MB34/24) e, como controle experimental, as cepas de referência *Sporothrix schenckii* ATCC 32286, *Sporothrix brasiliensis* ATCC MYA 4823 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (Borba-Santos *et al*., 2021; Carnero *et al*., 2024). As cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (HIMEDIA®, Índia) e, previamente a realização dos ensaios, foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) por um período de 5 a 7 dias, a 35–37 °C, para promover a conversão da forma filamentosa para a forma leveduriforme, sendo essa conversão confirmada por microscopia óptica (CX21, Olympus®, Japão), em aumento de 400×.

O método Checkerboard foi empregado para avaliação da interação entre os óleos essenciais, provenientes de *Lippia grata* Schauer e *Croton blanchetianus* Baill, e os antifúngicos clínicos, itraconazol e anfotericina B, utilizando placas de microdiluição de 96 poços, conforme descrito por Bonilla *et al.* (2021). Para a realização dos testes, foram selecionadas as cepas que apresentaram menor suscetibilidade aos antifúngicos nos testes prévios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), para melhor avaliar o efeito da combinação entre os compostos. Na montagem da placa, os óleos essenciais foram testados em concentrações variando de 4×CIM a 1/16×CIM e os antifúngicos de CIM a 1/16×CIM. Em cada poço foram adicionados 50 µL de cada substância, seguidos de 100 µL do inóculo padronizado. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e, posteriormente, realizou-se a leitura para determinação da interação entre os compostos.

Após a leitura dos ensaios Checkerboard, os resultados foram analisados pelo Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF), obtido a partir da relação entre a CIM de cada composto quando utilizado em associação e sua respectiva CIM, quando testado isoladamente. O valor final do ICIF corresponde à soma dos índices de concentração inibitória fracional do óleo essencial e do antifúngico, permitindo classificar a interação como sinérgica (ICIF ≤ 0,5), aditiva (0,5 < ICIF ≤ 1,0), indiferente (1,0 < ICIF < 4,0) ou antagônica (ICIF ≥ 4,0), conforme descrito por Poester *et al*. (2018). As interações ainda foram avaliadas pelo modelo Zero Interaction Potency (ZIP), utilizando o software SynergyFinder+ (Yadav *et al*., 2015; Zheng *et al*., 2022), no qual valores superiores a 10 indicam sinergismo, valores entre -10 e 10 indicam aditividade e inferiores a -10 representam antagonismo.

Para a avaliação da atividade antifúngica *in vivo*, foi utilizado o modelo experimental de *Galleria mellonella*, comumente conhecida como traça-da-cera (Marena *et al*., 2025). Inicialmente, foi realizado o teste de toxicidade dos óleos

essenciais e do itraconazol em larvas saudáveis, previamente selecionadas de acordo com o peso (100 mg à 150 mg) e o tamanho (2 cm à 2,5 cm). Os compostos foram então inoculados na última pró-perna esquerda das larvas, que permaneceram incubadas no escuro à 37 °C durante 10 dias para avaliação. Ao longo desse período, as larvas foram monitoradas diariamente quanto à motilidade, melanização, formação de casulo e sobrevivência, permitindo a determinação do índice de saúde (Loh *et al*., 2013). Posteriormente, foi realizado o ensaio para avaliar a atividade antifúngica *in vivo* dos compostos frente à infecção por *Sporothrix brasiliensis.* Com esse objetivo, as larvas foram infectadas com uma suspensão de células leveduriformes (*S. brasiliensis* ATCC MYA 4823) e, após uma hora, tratadas com os óleos essenciais e o itraconazol. Também foram estabelecidos grupos controle, compostos por larvas não infectadas, larvas infectadas sem tratamento e larvas infectadas tratadas apenas com o veículo, a fim de comparar a evolução da infecção e verificar os possíveis efeitos do veículo utilizado. Assim, após a incubação a 37 °C por 10 dias, com avaliações realizadas a cada 24 horas, a eficácia dos tratamentos foi determinada por meio da curva de sobrevivência e do índice de saúde (Borba-Santos *et al*., 2021; Loh *et al*., 2013). Também foi avaliada a carga fúngica das larvas infectadas após 48 horas de incubação. Para isso, foram coletados 10 µL de hemolinfa de duas larvas selecionadas aleatoriamente, que foram submetidos a diluições seriadas (base 10) em solução salina a 0,85%. Em seguida, 10 µL dessas diluições foram semeados em ágar Sabouraud dextrose contendo cloranfenicol (INLAB, Brasil) e as placas foram incubadas a 37 ºC por 72 horas. Ao final desse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL), permitindo avaliar o efeito dos tratamentos sobre a infecção (Borba-Santos *et al.*, 2021). Por fim, os dados de sobrevivência foram analisados por meio de curvas de Kaplan-Meier e do teste de log-rank, utilizando o software GraphPad Prism 8, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Quanto à avaliação da atividade combinada entre os óleos essenciais e o itraconazol pelo método Checkerboard, esta foi conduzida utilizando cepas previamente selecionadas a partir do perfil de suscetibilidade ao antifúngico, de modo que foram incluídas no estudo apenas aquelas que apresentaram valores de CIM superiores a 0,5 µg/mL. A partir dos resultados obtidos nesses ensaios, observou-se que a utilização combinada dos óleos essenciais com o itraconazol resultou, em sua maioria, em concentrações inibitórias inferiores às determinadas para os tratamentos individuais.
De maneira semelhante, a avaliação das combinações com a anfotericina B (AMB) também apresentou resultados favoráveis. Para esse antifúngico, as cepas selecionadas foram aquelas com CIM de 8 e 16 µg/mL e, assim como observado para o itraconazol, as associações com os óleos essenciais promoveram redução dos valores de CIM em comparação aos compostos isolados. Esses resultados demonstram uma tendência semelhante entre os dois

antifúngicos, indicando que a associação com os óleos essenciais pode contribuir para potencializar a atividade antifúngica frente a *Sporothrix brasiliensis*, sugerindo seu potencial como estratégia complementar aos tratamentos convencionais.

Na análise pelo ICIF, a associação entre OELg e itraconazol apresentou predominância de interações aditivas, sendo esse efeito observado em oito das nove cepas avaliadas (88,8%), enquanto apenas uma cepa (11,2%) apresentou sinergismo. Em relação ao OECb associado ao itraconazol, foram observadas respostas semelhantes entre os dois tipos de interação, com três cepas apresentando efeito aditivo (50%) e três classificadas como sinérgicas (50%). De forma geral, a análise pelo modelo ZIP apresentou resultados consistentes com aqueles observados pelo ICIF, embora com algumas diferenças na classificação das interações. Para a combinação entre OELg e itraconazol, seis cepas (66,6%) apresentaram efeito aditivo e três (33,3%) foram classificadas como sinérgicas. Já a associação entre OECb e itraconazol apresentou maior frequência de interações sinérgicas, observadas em cinco cepas (83,3%), enquanto uma cepa (16,7%) apresentou efeito aditivo.

Em relação às combinações com a anfotericina B (AMB), a análise pelo ICIF demonstrou que a associação entre OELg e AMB apresentou efeito sinérgico em duas das dez cepas avaliadas (20%), enquanto as demais oito cepas (80%) apresentaram efeito aditivo. Para a combinação entre OECb e AMB, foram observadas três cepas com interação sinérgica (30%) e sete classificadas como aditivas (70%).

A análise pelo modelo ZIP apresentou resultados semelhantes aos observados pelo ICIF, mantendo a mesma tendência geral das interações. No entanto, algumas diferenças foram observadas em relação às cepas classificadas em cada tipo de interação, evidenciando uma variação na resposta de algumas cepas entre os modelos de análise. Para a combinação entre OELg e AMB, duas cepas (20%) apresentaram efeito sinérgico, enquanto oito (80%) foram classificadas como aditivas. Já para a associação entre OECb e AMB, três cepas (30%) apresentaram sinergismo e sete (70%) efeito aditivo.

Após as análises da interação *in vitro*, foram realizadas as avaliações de toxicidade e atividade antifúngica dos óleos essenciais no modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*. No que se refere à avaliação da toxicidade dos óleos essenciais, observou-se que a administração das maiores doses de OELg e OECb não causou redução da sobrevivência das larvas, mantendo 100% de sobrevivência ao longo do período avaliado. Além disso, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas curvas de sobrevivência dos grupos tratados quando comparadas aos controles sem injeção e do veículo, indicando ausência de toxicidade nas concentrações testadas.

Na avaliação da infecção por *Sporothrix brasiliensis*, o grupo controle de infecção apresentou mortalidade total (100%) até o nono dia, confirmando a adequação do modelo experimental e do inóculo utilizado. Em relação aos tratamentos, o OELg apresentou comportamento dependente da dose, sendo que a menor concentração (10 mg/kg) não promoveu melhora significativa na sobrevivência das larvas, enquanto a maior dose (40 mg/kg) resultou em mortalidade total ao quinto dia. Por outro lado, a dose intermediária (20 mg/kg) apresentou efeito protetor, com redução significativa da mortalidade em comparação ao controle de infecção e ao tratamento com itraconazol, alcançando 40% de sobrevivência ao final dos 10 dias de acompanhamento ($p < 0,05$).

Já para o OECb, não foram observadas diferenças estatísticas entre as doses avaliadas e o controle de infecção. As doses de 20 (menor dose) e 80 (maior dose) mg/kg apresentaram 0% de sobrevivência ao final do período avaliado, enquanto a dose intermediária de 40 mg/kg resultou em 20% de sobrevivência, com esse resultado não atingindo o nível de significância adotado. Além disso, as análises do índice de saúde e da carga fúngica demonstraram que nenhum dos óleos essenciais apresentou alterações significativas nesses parâmetros em comparação ao controle, sugerindo que não houve efeito estatisticamente detectável sobre a progressão da infecção.

Os resultados obtidos neste estudo apresentam relevância diante da necessidade de novas estratégias para o controle das infecções fúngicas, uma vez que estas representam um importante desafio para a saúde pública, principalmente devido às limitações relacionadas ao tratamento, como a resistência antifúngica, a toxicidade dos medicamentos disponíveis e a dificuldade de controle em pacientes mais vulneráveis (Case *et al.*, 2025). Nesse contexto, a esporotricose tem ganhado destaque pelo perfil de disseminação, especialmente pela transmissão zoonótica associada a *Sporothrix brasiliensis*, tornando necessária a busca por novas alternativas terapêuticas (Rodrigues *et al.*, 2022). Dessa forma, os produtos naturais, incluindo os óleos essenciais, têm sido investigados como fontes promissoras de compostos bioativos capazes de atuar contra diferentes microrganismos de interesse clínico, especialmente contra fungos emergentes (Nazzaro *et al.*, 2017), com potencial para subsidiar o desenvolvimento de novos protótipos de interesse para a indústria químico-farmacêutica (Baptista-Silva *et al.*, 2020).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais está associada principalmente à presença de compostos como monoterpenos e sesquiterpenos, que podem atuar sobre diferentes estruturas das células fúngicas. Esses componentes apresentam a capacidade de alterar a membrana celular, interferir no transporte de íons, afetar a produção de ergosterol e estimular a formação de espécies reativas de oxigênio, comprometendo a sobrevivência do fungo (Oliveira *et al.*, 2020; Raj *et al.*, 2024). Dessa forma, os mecanismos descritos podem contribuir para a ação antifúngica observada neste estudo, no qual os óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus* apresentaram atividade frente a *S. brasiliensis*, reforçando o potencial antifúngico desses gêneros.

Estudos anteriores já demonstraram que óleos essenciais pertencentes aos gêneros *Lippia* e *Croton* apresentam atividade antifúngica frente a diferentes espécies de fungos. O óleo essencial de *L. grata*, por exemplo, já foi descrito como ativo contra leveduras e fungos filamentosos, enquanto espécies de *Croton* apresentam ação antifúngica associada principalmente a alterações na membrana celular e à produção de espécies reativas de oxigênio (Malveira *et al.*, 2022). Além disso, os óleos essenciais de *Lippia graveolens* e *Croton ruizianus* já demonstraram atividade contra espécies do gênero *Sporothrix*, corroborando os resultados encontrados neste estudo (Castellanos, 2007; Gaitan *et al.*, 2011).

Além da atividade isolada dos óleos essenciais, a associação com antifúngicos normalmente empregados na prática clínica pode representar uma estratégia promissora para potencializar a ação terapêutica e reduzir algumas limitações relacionadas aos tratamentos disponíveis. Neste trabalho, as associações entre OELg e OECb com o itraconazol e a anfotericina B resultaram, de forma geral, na redução dos valores de CIM em comparação aos compostos utilizados

isoladamente, sugerindo que os óleos essenciais podem contribuir para aumentar a atividade antifúngica. Resultados semelhantes já haviam sido observados em outros estudos envolvendo óleos essenciais, como na pesquisa de Sales (2023), que identificou interações positivas entre o óleo essencial de *L. grata* e a anfotericina B frente a *Candida albicans*, com predominância de efeitos aditivos e ocorrência de sinergismo. De forma semelhante, o óleo essencial de *Origanum vulgare* associado ao itraconazol apresentou efeitos aditivos e sinérgicos contra *Cryptococcus neoformans* (Scalas *et al.*, 2018). Quanto à classificação das interações, a avaliação pelo ICIF e pelo modelo ZIP demonstrou predominância de interações aditivas, com ocorrência de sinergismo em algumas cepas para ambas as combinações avaliadas. Para o OELg associado ao itraconazol, observou-se maior frequência de aditividade, enquanto a combinação com OECb apresentou maior proporção de interações sinérgicas pelo modelo ZIP. Com relação à anfotericina B, ambas as associações apresentaram principalmente efeito aditivo, embora tenha sido observado sinergismo em algumas cepas. Esses resultados mostram que a resposta das combinações pode variar conforme a cepa avaliada e o modelo matemático utilizado, mas reforçam a existência de uma interação positiva entre os óleos essenciais e os antifúngicos testados, o que pode favorecer, futuramente, o uso de menores concentrações dos antifúngicos e, consequentemente, a redução da exposição aos medicamentos e seus possíveis efeitos adversos, além de ampliar as possibilidades de associação no tratamento da esporotricose. Essa possibilidade é particularmente importante para a anfotericina B, cujo uso pode estar relacionado à nefrotoxicidade e para o itraconazol, que pode causar alterações hepáticas, principalmente em tratamentos prolongados (Augostine e Avery, 2022; Orofino-Costa *et al.*, 2022).

No que diz respeito à avaliação *in vivo*, os resultados obtidos no modelo de *Galleria mellonella* mostraram que os óleos essenciais não apresentaram toxicidade nas doses avaliadas. As maiores doses de OELg e OECb mantiveram 100% de sobrevivência das larvas e não diferiram dos grupos controle. Esse achado se destaca, uma vez que a atividade inseticida de alguns óleos essenciais já foi observada em diferentes modelos, incluindo *G. mellonella* (Bisht *et al*., 2017; Su *et al*., 2024). Por outro lado, estudos com OELg e OECb também relataram baixa toxicidade em outros modelos animais, como camundongos, o que está de acordo com os resultados encontrados neste estudo (Freitas *et al.*, 2020).

Todavia, apesar da ausência de toxicidade, a atividade terapêutica no modelo de infecção apresentou resposta limitada. O OELg apresentou melhor resultado na dose de 20 mg/kg, que aumentou significativamente a sobrevivência das larvas em comparação ao controle de infecção. Já nas outras doses avaliadas, esse efeito não foi observado. Para o OECb, nenhuma das doses testadas apresentou diferença estatística na sobrevivência em relação ao controle de infecção. Além disso, também não foram observadas alterações na carga fúngica e no índice de saúde das larvas que atingissem o nível de significância adotado, indicando que os tratamentos não foram suficientes para controlar a infecção.

Outros estudos com óleos essenciais em modelos de infecção por *G. mellonella* também mostram que os resultados podem variar de acordo com a dose, o fungo avaliado e as condições utilizadas no tratamento. Os óleos essenciais de *Origanum majorana* e *Origanum vulgare*, por exemplo, apresentaram resultados

mais expressivos contra espécies de *Candida*, mas foram necessárias doses maiores do que as empregadas no presente estudo (Kaskatepe *et al.*, 2022; Stringaro *et al*., 2022). Dessa forma, a avaliação de outras doses, esquemas de reaplicação e diferentes modelos animais pode ajudar a esclarecer melhor o potencial desses óleos no tratamento da esporotricose.
Em suma, os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre a ação dos óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus* frente a *S. brasiliensis*, principalmente quanto às interações com os antifúngicos convencionais e à sua resposta no modelo *in vivo*. Embora os efeitos observados no modelo de *Galleria mellonella* ainda sejam limitados, a ausência de toxicidade e a resposta obtida com determinadas concentrações indicam potencial para estudos futuros. Nesse sentido, investigações adicionais são necessárias para aprofundar o conhecimento sobre esses óleos e compreender melhor seu potencial terapêutico.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível constatar que a associação dos óleos essenciais de *Lippia grata* e *Croton blanchetianus* aos antifúngicos avaliados resultou predominantemente em interações farmacológicas positivas, principalmente aditivas, com ocorrência de sinergismo em algumas cepas. Esses achados reforçam a possibilidade de utilizar os óleos como uma nova abordagem terapêutica, especialmente em combinação com o itraconazol e a anfotericina B, o que pode possibilitar o uso de menores concentrações desses medicamentos, contribuindo para a redução dos efeitos indesejados associados ao seu uso e ampliando as opções de tratamento. Quanto à avaliação *in vivo* no modelo de *Galleria mellonella*, os dois óleos apresentaram baixa toxicidade nas doses avaliadas. No entanto, na avaliação terapêutica, somente o OELg na dose de 20 mg/kg promoveu aumento da sobrevivência das larvas infectadas, diferindo significativamente do controle de infecção, ao passo que nenhuma das doses de OECb alcançou o nível de significância estabelecido. Apesar dos resultados ainda limitados no controle da infecção, os dados obtidos indicam o potencial dos óleos estudados e a importância da continuidade das pesquisas. Assim, estudos futuros fazem-se necessários, podendo avaliar diferentes doses e formas de administração, além dos principais constituintes dos óleos, seus mecanismos de ação e sua atividade em outros modelos animais, contribuindo para uma avaliação mais completa da bioatividade desses compostos.

Referências

ALVES, Pedro Lucas Vieira. Prospecção dos óleos essenciais de Lippia grata Schauer (1847) e Croton blanchetianus Baill (1864) contra Sporothrix brasiliensis. 2026. Tese de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2026.

ARAÚJO, F. M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Croton heliotropiifolius Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 203–206, 1 out. 2017.

AUGOSTINE, C. R.; AVERY, S. V. Discovery of Natural Products With Antifungal Potential Through Combinatorial Synergy. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 26 abr. 2022.

BAPTISTA-SILVA, Sara et al. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 4, p. 279–295, 20 abr. 2020.

BISHT, K. et al. Efficacy of Some Essential Oils against the Greater Wax Moth (Galleria mellonella L.) under Storage Condition. **Environment & Ecology**, v. 35, n. 4, p. 2760–2763, 2017.

BONILLA, J. J. A. et al. Antifungal Activity of Acylhydrazone Derivatives against Sporothrix spp.. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 5, 19 abr. 2021.

BORBA-SANTOS, L. P. et al. In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Buparvaquone against Sporothrix brasiliensis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 9, 17 ago. 2021.

BORBA-SANTOS, L. P. et al. A novel naphthoquinone derivative shows selective antifungal activity against Sporothrix yeasts and biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 749–758, 8 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano Nacional de Saúde 2024-2027**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [2024]. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_saude_pns_2024_2027.pdf>.

CARNERO, L. C. G. et al. Milteforan, a promising veterinary commercial product against feline sporotrichosis. **Microbiology Spectrum**, 28 ago. 2024.

CASE, N. T. et al. Fungal impacts on Earth's ecosystems. **Nature**, v. 638, n. 8049, p. 49–57, 5 fev. 2025.

CASTELLANOS, M. J. R. Actividad de seis extractos de hierbas usadas medicinalmente contra Fonsecaea pedrosoi y Sporothrix schenckii. Disponível em: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/QB857.pdf>.

COSTA, P. S. et al. Antifungal activity and synergistic effect against Trichophyton rubrum and Candida spp. of the aerial parts essential oil from Lippia alba. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, 2020.

FREITAS, A. F. S. et al. Toxicity assessment and antinociceptive activity of an ethanolic extract from Croton blanchetianus (Euphorbiaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 133, p. 30–39, 1 set. 2020.

FROZ, Maria Juliana da L. et al. Lippia alba essential oil: A powerful and valuable antinociceptive and anti-inflammatory medicinal plant from Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 333, p. 118459, 28 out. 2024.

GAITÁN, I. et al. Subcutaneous antifungal screening of Latin American plant extracts against Sporothrix schenckii and Fonsecaea pedrosoi. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 9, p. 907–919, 19 maio 2011.

GUILHON, C. C. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and

antinociceptive activities and the mechanism of the action of Lippia gracilis essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 406–413, 1 maio 2011.
HERNÁNDEZ-CASTRO, R. et al. Epidemiology of Clinical Sporotrichosis in the Americas in the Last Ten Years. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 588, 30 maio 2022.
KASKATEPE, B. et al. Antifungal and Anti-Virulent Activity of Origanum majorana L. Essential Oil on Candida albicans and In Vivo Toxicity in the Galleria mellonella Larval Model. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 663–663, 20 jan. 2022.
LIMA, A. S. et al. Anthelmintic effect of essential rhizome oil from Hedychium coronarium Koenig (Zingiberaceae) introduced in Northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 218, p. 105912, jun. 2021.
LOH, J. M. et al. Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, jul. 2013.
MACIEL TOMAZZOLI, Maíra et al. Chemical analyses and antioxidant activity of the essential oils from Baccharis dracunculifolia DC. in Southern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 36, n. 4, p. 342–352, 25 abr. 2024.
MALVEIRA, E. A. et al. Essential Oil from Croton blanchetianus Leaves: Anticandidal Potential and Mechanisms of Action. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1147, 29 out. 2022.
MARENA, Gabriel Davi et al. Galleria mellonella as an Invertebrate Model for Studying Fungal Infections. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 2, p. 157–157, 18 fev. 2025.
NAZZARO, F. et al. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2 nov. 2017.
OLIVEIRA, T. N. S. et al. Antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of leaves from Lippia gracilis Schauer against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1117–1129, 2 out. 2020.
OROFINO-COSTA, R. et al. Esporotricose humana: recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 6, p. 757–777, 1 nov. 2022.
ORGANIZATION, W. H. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>.
POESTER, V. R. et al. Antifungal activity of diphenyl diselenide alone and in combination with itraconazole against Sporothrix brasiliensis. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 328–331, 19 jun. 2018.
RAJ, N. et al. Antifungal Efficacy of Terpenes and Mechanism of Action Against Human Pathogenic Fungi. **Advances in Antifungal Drug Development**, p. 315–341, 2024.
RODRIGUES, A. M. et al. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 776, 1 ago. 2022.
RODRIGUES, A. M.; HAGEN, F.; DE CAMARGO, Z. P. A Spotlight on Sporothrix and Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 407–411, 1 jul. 2022.
ROSA, João Victor Moura; QUARESMA, Juarez Antônio Simões. Sporotrichosis: an overview of the neglected disease reported worldwide in the last five years. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 58, 2025.
SALES, F. N. Atividade antifúngica do óleo essencial de Lippia grata Schauer

frente Candida albicans e dermatófitos. 2023. Tese de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.
SCALAS, D. et al. Use of Pinus sylvestris L. (Pinaceae), Origanum vulgare L. (Lamiaceae), and Thymus vulgaris L. (Lamiaceae) essential oils and their main components to enhance itraconazole activity against azole susceptible/not-susceptible Cryptococcus neoformans strains. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 3 maio 2018.
SHARMA, B.; SHARMA, A. K.; SHARMA, U. Sporotrichosis: a Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. **Current Dermatology Reports**, 17 mar. 2022.
SOARES, Igor Lima et al. Multifunctional activity of Lippia gracilis Schauer essential oil against skin infections. **Plants**, v. 15, n. 11, p. 1681, 29 maio 2026.
STRINGARO, A. et al. "In vivo" and "in vitro" antimicrobial activity of Origanum vulgare essential oil and its two phenolic compounds on clinical isolates of Candida spp.. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 1, 7 dez. 2022.
SU, X.-L. et al. Active Components of 16 Essential Oils and Their Fumigation Effects on Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae). **Insects**, v. 15, n. 12, p. 977, 9 dez. 2024.
YADAV, B. et al. Searching for Drug Synergy in Complex Dose–Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 504–513, 2015.
ZHENG, S. et al. SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 20, n. 3, p. 587–596, jun. 2022.

Anexos



Figura1 - Resumo do trabalho: Potencial antifúngico dos óleos essenciais de Lippia grata e Croton blanchetianus contra Sporothrix spp.



Figura 2 - Resumo da metodologia empregada nos estudos in vitro e in vivo utilizando os óleos essenciais e antifúngicos contra Sporothrix spp.



Figura 3 - índices de saúde observados nos testes de toxicidade para os óleos essenciais.



Figura 4 - Efeito do OELg e OECb em diferentes doses no tratamento in vivo de modelo experimental de G. mellonella para S. brasilienses.



Tabela 1 - Cálculo do índice de concentração inibitória fracionada e o caráter de interação entre o OELg e o itraconazol na forma leveduriforme.



Tabela 2 - Cálculo do índice de concentração inibitória fracionada e o caráter de interação entre o OECb e o itraconazol na forma leveduriforme.



Tabela 3 - Cálculo do índice de concentração inibitória fracionada e o caráter de interação entre o OELg e a anfotericina B na forma leveduriforme.



Tabela 4 - Cálculo do índice de concentração inibitória fracionada e o caráter de interação entre o OECb e a anfotericina B na forma leveduriforme.



Tabela 5 - Classificação da interação, segundo o ZIP score, entre os óleos essenciais de Lippia grata e Croton blanchetianus combinados com itraconazol na forma leveduriforme.



Tabela 6 - Classificação da interação, segundo o ZIP score, entre os óleos essenciais de Lippia grata e Croton blanchetianus combinados com anfotericina B na forma leveduriforme.

CÓDIGO: SB0133

AUTOR: ANA LUIZA FERREIRA DE ARAUJO

ORIENTADOR: SILVIA REGINA BATISTUZZO DE MEDEIROS

TÍTULO: Efeito do Material Particulado (MP) da queima da cana-de-açúcar sobre a metilação global em celulas pulmonares

Resumo

A poluição atmosférica representa um importante obstáculo para a saúde pública, especialmente pela presença de material particulado (MP), capaz de atingir o sistema respiratório e desencadear diversos efeitos maléficos à saúde. Entre as fontes antropogênicas responsáveis pela emissão de MP, destaca-se a queima da cana-de-açúcar, prática que libera uma mistura complexa de compostos potencialmente tóxicos. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo investigar se o material particulado proveniente da queima da palha da cana-de-açúcar é capaz de alterar o padrão de metilação global do DNA em células pulmonares humanas da linhagem A549. Para isso, o estudo propõe a avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT, seguida da extração de DNA e da análise de metilação utilizando a técnica de Restrição Combinada com Bissulfito (COBRA), associada à eletroforese em gel. Também será avaliada a expressão dos genes DNMT1, DNMT3A e DNMT3B por RT-qPCR, a fim de investigar possíveis alterações nos mecanismos envolvidos na regulação da metilação do DNA. Dessa forma, o estudo busca contribuir para a compreensão dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e epigenéticos associados à exposição ao material particulado da queima da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Poluição Atmosférica. Material Particulado. Metilação Global do DNA.

TITLE: Analysis of the Effect of Particulate Matter (PM) from Sugarcane Burning on Global Methylation

Abstract

Air pollution represents a major challenge to public health, particularly due to the presence of particulate matter (PM), which can reach the respiratory system and trigger several adverse health effects. Among the anthropogenic sources responsible for PM emissions, sugarcane burning stands out as a practice that releases a complex mixture of potentially toxic compounds. In this context, this study aims to investigate whether particulate matter derived from sugarcane straw burning is capable of altering the global DNA methylation pattern in human A549 lung cells. Cell viability will be assessed using the MTT assay, followed by DNA extraction and methylation analysis using the Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) technique associated with gel electrophoresis. The expression of the DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B genes will also be evaluated by RT-qPCR to investigate possible changes in the mechanisms involved in DNA methylation regulation. Thus, this study seeks to contribute to the understanding of the cytotoxic, genotoxic, and epigenetic effects associated with exposure to particulate matter from sugarcane burning.

Keywords: Air Pollution. Particulate Matter. Global DNA Methylation.

Introdução

Um dos principais problemas ambientais que afetam a saúde humana atualmente é a poluição atmosférica (Ghazi Terisha et al., 2021). Em 2019, foram registradas aproximadamente 6,67 milhões de mortes em todo o mundo que estavam atreladas à exposição de contaminantes atmosféricos (Engels et al., 2024).

A emissão dessas substâncias químicas na atmosfera pode ser decorrente tanto de fontes naturais quanto de fontes antropogênicas (Loomis et al., 2013). As fontes naturais são causadas em sua maioria por incêndios florestais e erupções vulcânicas (Engels et al., 2024). Por outro lado, entre as atividades provenientes da ação humana capazes de afetar a qualidade do ar, tem-se a prática agrícola da queima da cana-de-açúcar, responsável pela liberação de diversos contaminantes no ar exterior, incluindo os precursores de ozônio, gases do efeito estufa e o Material Particulado (MP) (França et al., 2012).

Nesse contexto, o MP é um dos principais poluentes atmosféricos, sendo constituído por uma complexa mistura heterogênea de compostos químicos (Zhang et al., 2024). De acordo com as Diretrizes Globais de Qualidade do Ar da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021) foram publicadas evidências consistentes acerca dos riscos à saúde associados à exposição do MP. Entre as partículas de maior relevância, destacam-se aquelas com diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a 10 μm (MP_{10}) e 2,5 μm ($MP_{2,5}$), devido à sua capacidade de penetrar profundamente no sistema respiratório. Nesse sentido, o $MP_{2,5}$ possui maior notoriedade, tendo em vista que suas partículas podem atingir a circulação sanguínea, contribuindo para diferentes efeitos adversos à saúde.

Estudos demonstraram que apenas uma única inalação de partículas oriundas da queima de cana-de-açúcar foi capaz de provocar alterações nocivas na histologia e na função pulmonar (Mazzoli-Rocha et al., 2014), assim como, a exposição crônica à poluição do ar pode levar ao desenvolvimento de doenças sistêmicas pulmonares e cardiovasculares, além de favorecer a depleção da função cognitiva do sistema nervoso e do sistema imunológico (Schraufnagel et al., 2019).

O surgimento dessas enfermidades está associada, entre outros fatores, à ação do MP em nível molecular. Seus efeitos citotóxicos e genotóxicos em células epiteliais pulmonares, são capazes de induzir danos ao DNA, podendo ser atribuídos ao estresse oxidativo e a diferentes lesões na molécula de DNA (Melzi et al., 2024). Além desses danos, a exposição ao MP também pode promover modificações epigenéticas, sobretudo as alterações no padrão de metilação (Macrì et al., 2025).

Diante deste contexto, o presente estudo busca investigar se o material particulado proveniente especificamente da queima da cana-de-açúcar é capaz de modificar o padrão de metilação global do DNA em células pulmonares humanas.

Metodologia

1. O Ensaio de sal de tetrazólio (MTT): será realizado testes com diferentes concentrações da amostra do material particulado, para verificar a atividade metabólica celular e a sua possível citotoxicidade para a linhagem celular A549, como descrito por (Stockert et al., 2018), os ensaios de viabilidade celular por meio do MTT permitem uma leitura fotométricas das placas e avaliação semiautomática, além de requerer pouco tempo para sua realização e serem de simples aplicação.

2. A Extração do DNA: As extrações serão realizadas utilizando o kit comercial Illustra TriplePrep (Cytiva), adequado para a extração e purificação simultânea do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), do Ácido Ribonucleico (RNA) e das proteínas, seguindo o protocolo de acordo com as indicações do fabricante.

3. A análise de Restrição Combinada com Bissulfito (COBRA): O método COBRA, consiste em analisar os níveis de metilação do DNA, em loci gênicos específicos de regiões que possuem elementos repetitivos, sua realização ocorre em três etapas. Primeiramente, o tratamento do DNA genômico é extraído com bissulfito de sódio; a segunda etapa, corresponde à amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos genes em análise; e o terceiro passo, a digestão por enzima de restrição que revela as diferenças de sequências metilados nos produtos da amplificação (Xiong e Laird, 1997; Yang et al., 2004).

4. Eletroforese em Gel: Esta técnica será utilizada para visualizar os fragmentos do DNA, após a amplificação pelo PCR e digestão por enzimas, de modo que a eletroforese em gel age de acordo com a carga e/ou o peso molecular das partículas, ao ser aplicado uma corrente elétrica, que irá ocasionar a migração das partículas de um pólo a outro pelo gel, permitindo assim, a separação das moléculas. (Oliveira et al., 2015).

5. A PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR): Esta abordagem permite quantificar a transcrição gênica por meio de etapas que incluem a transcrição reversa, em que a enzima transcriptase reversa sintetiza uma fita de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA, seguida pela amplificação do cDNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, por fim, a detecção em tempo real dos produtos amplificados, o que confere à técnica seu caráter quantitativo (Ladeira, Isaac e Ferreira, 2011).

Tendo como base a técnica RT-qPCR e o entendimento de que a metilação do DNA é mediada por enzimas da família das DNA metiltransferases (DNMTs), atuando as DNMT3A e DNMT3B na metilação de novo, que estabelecem padrões de metilação em DNA ainda não modificado, enquanto a DNMT1 atua na manutenção desses padrões durante a replicação do DNA (Moore, Le e Fan, 2013). Para a realização da PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR), será usado primers específicos para cada um dos genes que codificam as enzimas DNA metiltransferase 1, DNA metiltransferase 3A e a DNA metiltransferase 3B, com o propósito de medir a expressão em níveis de mRNA nas amostras tratadas com o material particulado, a fim de corroborar com os resultados da análise de metilação global do DNA.

Resultados e Discussões

Durante o período vigente da pesquisa, houve a transferência do projeto entre discentes.

Os experimentos iniciais foram feitos pela aluna anteriormente vinculada ao plano de trabalho, a qual concluiu sua graduação no período letivo de 2026.1. No entanto, apesar de diversas tentativas na execução dos ensaios, não foi possível obter resultados satisfatórios.

Além disso, quando a atual discente ingressou no projeto, ficou inviável continuar os experimentos, uma vez que os kits experimentais disponíveis apresentavam falhas de funcionamento e não permitiram a execução confiável dos testes planejados.

Assim, diante da impossibilidade de reproduzir os ensaios e de validá-los adequadamente, não foram obtidos dados suficientes e confiáveis para a construção dos resultados e discussão de forma fundamentada.

Conclusão

A continuidade do projeto foi comprometida por limitações técnicas relacionadas ao funcionamento dos kits experimentais, que impediram a repetição dos testes e a obtenção de novos dados. Dessa forma, não foi possível alcançar os objetivos inicialmente propostos nem apresentar conclusões fundamentadas nos resultados disponíveis.

Mas vale salientar que ainda é de suma importância verificar se o MP derivado da queima da cana-de-açúcar possui capacidade de alterar a metilação global do DNA das células pulmonares humanas, visto seus efeitos deletérios anteriormente

Referências

ENGELS, S. M.; KAMAT, P.; PAFILIS, G. S.; LI, Y.; AGRAWAL, A.; HALLER, D. J.; PHILLIP, J. M.; CONTRERAS, L. M. Particulate matter composition drives differential molecular and morphological responses in lung epithelial cells. PNAS Nexus, v. 3, n. 1, art. pgad415, 2024. DOI: https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad415.

FRANÇA, D. A.; LONGO, K. M.; SOARES NETO, T. G.; SANTOS, J. C.; FREITAS, S. R.; RUDORFF, B. F. T.; CORTEZ, E. V.; ANSELMO, E.; CARVALHO JÚNIOR, J. A. Pre-harvest sugarcane burning: determination of emission factors through laboratory measurements. Atmosphere, v. 3, n. 1, p. 164–180, 2012. DOI: https://doi.org/10.3390/atmos3010164.

GHAZI, T.; NAIDOO, P.; NAIDOO, R. N.; CHUTURGOON, A. A. Prenatal air pollution exposure and placental DNA methylation changes: implications on fetal development and future disease susceptibility. Cells, v. 10, n. 11, art. 3025, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/cells10113025.

LADEIRA, P. R. S. de; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. Revista de Medicina, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 47–51, 2011. DOI: https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v90i1p47-51.

LI, J.; LI, W. X.; BAI, C.; SONG, Y. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. The Clinical Respiratory Journal, v. 11, n. 5, p. 539–546, 2017. DOI: https://doi.org/10.1111/crj.12389.

LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; LAUBY-SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; BAAN, R.; MATTOCK,

H.; STRAIF, K. The carcinogenicity of outdoor air pollution. The Lancet Oncology, v. 14, n. 13, p. 1262–1263, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X.

MACRÌ, M.; GEA, M.; MARANGON, D.; PITASI, F. A.; FONTANA, M.; BONETTA, S.; SCHILIRÒ, T.; BONETTA, S. In vitro evaluation of genotoxicity and methylation changes induced by particulate matter from the Padana Plain. Air Quality, Atmosphere & Health, v. 18, n. 9, p. 2853–2867, 2025. DOI: https://doi.org/10.1007/s11869-025-01804-6.

MAZZOLI-ROCHA, F.; CARVALHO, G. M. C.; LANZETTI, M.; VALENÇA, S. S.; SILVA, L. F. F.; SALDIVA, P. H. N.; ZIN, W. A.; FAFFE, D. S. Respiratory toxicity of repeated exposure to particles produced by traffic and sugar cane burning. Respiratory Physiology & Neurobiology, v. 191, p. 106–113, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.11.004.

MELZI, G.; MASSIMI, L.; FREZZINI, M. A.; IULINI, M.; TARALLO, N.; RINALDI, M.; PAGLIONE, M.; NOZZA, E.; CROVA, F.; VALENTINI, S.; VALLI, G.; COSTABILE, F.; CANEPARI, S.; DECESARI, S.; VECCHI, R.; MARINOVICH, M.; CORSINI, E. Redox-activity and in vitro effects of regional atmospheric aerosol pollution: seasonal differences and correlation between oxidative potential and in vitro toxicity of PM1. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 485, art. 116913, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.116913.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology, v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013. DOI: https://doi.org/10.1038/npp.2012.112.

OLIVEIRA, E. de; TRENTIN, T. de C.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D. P.; MARTINS, D. B. Eletroforese: conceitos e aplicações. Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 1129–1149, dez. 2015. DOI: https://doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_149.

SCHRAUFNAGEL, D. E.; BALMES, J. R.; COWL, C. T.; DE MATTEIS, S.; JUNG, S.-H.; MORTIMER, K.; PEREZ-PADILLA, R.; RICE, M. B.; RIOJAS-RODRIGUEZ, H.; SOOD, A.; THURSTON, G. D.; TO, T.; VANKER, A.; WUEBBLES, D. J. Air pollution and noncommunicable diseases: a review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: air pollution and organ systems. Chest, v. 155, n. 2, p. 417–426, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.041.

STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L. L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. Acta Histochemica, v. 120, n. 3, p. 159–167, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global air quality guidelines: particulate matter ($PM_{2.5}$ and PM_{10}), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. Geneva: World Health Organization, 2021. 290 p. ISBN 978-92-4-003422-8. Disponível em:

https://www.who.int/publications/i/item/9789240034228. Acesso em: 7 ago. 2026.

XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Research, v. 25, n. 12, p. 2532–2534, 1997. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/25.12.2532.

YANG, A. S.; ESTÉCIO, M. R. H.; DOSHI, K.; KONDO, Y.; TAJARA, E. H.; ISSA, J.-P. J. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Research, v. 32, n. 3, art. e38, 2004. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gnh032.

ZHANG, C. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons emissions from biomass-fueled boilers in China. Journal of Hazardous Materials, v. 480, p. 135764, 2024.

CÓDIGO: SB0134

AUTOR: JOSE ROBERTO LOURENÇO FILHO

ORIENTADOR: DANIEL MARQUES DE ALMEIDA PESSOA

TÍTULO: Plasticidade de cor em caranguejo chama-maré: Mudanças rápidas de coloração em Leptuca leptodactyla.

Resumo

Este estudo investigou a variação da luminância corporal, em *Leptuca leptodactyla* ao longo de sessões fotográficas de 10 minutos em duas populações da espécie, localizadas no município de Extremoz, Rio Grande do Norte, Brasil: uma em manguezal natural, em Barra do Rio, e outra nas proximidades do Centro de Tecnologia de Aquicultura (CTA/UFRN). Doze indivíduos, sendo seis machos e seis fêmeas, foram fotografados a cada 20 segundos após a captura, e a luminância foi estimada por meio de modelagem de captura quântica dos fotorreceptores visuais, utilizando o ImageJ/micaToolbox. Modelos lineares mistos revelaram uma redução significativa e progressiva da luminância ao longo do tempo na maioria dos grupos analisados ($p < 0,001$), padrão consistente com um rápido escurecimento após a captura. A exceção foi o grupo de fêmeas de Barra do Rio, que não apresentou alteração temporal significativa. A comparação com a luminância do substrato pareado revelou padrões temporais distintos entre animal e substrato. A magnitude da alteração foi maior na população do CTA do que em BR. Os resultados fornecem evidências iniciais de plasticidade da coloração em escala temporal de minutos em *L. leptodactyla* e sugerem variação na resposta entre machos e fêmeas de diferentes populações, destacando a necessidade de investigações futuras sobre os mecanismos fisiológicos e as possíveis funções ecológicas dessa resposta.

Palavras-chave: Plasticidade fenotípica. Mudança de coloração. Cromatóforo.

TITLE: Color plasticity in fiddler crabs: Rapid color changes in Leptuca leptodactyla.

Abstract

This study investigated body luminance variation, in *Leptuca leptodactyla*, during 10-minute photographic sessions in two populations of the species

located in Extremoz, Rio Grande do Norte, Brazil: one inhabiting a natural mangrove area at Barra do Rio and another located near the Aquaculture Technology Center (CTA/UFRN). Twelve individuals, comprising six males and six females, were photographed every 20 seconds after capture, and luminance was estimated through quantum catch modelling of visual photoreceptors using ImageJ/micaToolbox. Linear mixed models revealed a significant and progressive decrease in luminance over time in most groups analysed ($p < 0.001$), a pattern consistent with rapid darkening following capture. The exception was the female group from Barra do Rio, which showed no significant temporal change. Comparison with paired substrate luminance revealed distinct temporal patterns between animals and substrates. The magnitude of the change was greater in the CTA population than in BR. These results provide initial evidence of short-term coloration plasticity in *L. leptodactyla* and suggest variation in the response between males and females of different populations, highlighting the need for further investigation into the physiological mechanisms and potential ecological functions underlying this response.

Keywords: Phenotypic plasticity. Color change. Chromatophore.

Introdução

Os Brachyura, conhecidos popularmente como caranguejos verdadeiros, constituem um grupo taxonômico altamente diversificado, com mais de 7.000 espécies descritas. Seus representantes apresentam ampla diversidade morfológica, ecológica e comportamental, ocupando ambientes marinhos, dulcícolas e terrestres (Tsang et al., 2014). Entre as características que se destacam nesse grupo está a elevada diversidade de colorações corporais, que pode abranger diferentes comprimentos de onda do espectro visível, incluindo tonalidades de vermelho, laranja, amarelo, verde e azul (Caro, 2018). Adicionalmente, algumas espécies são capazes de refletir radiação na faixa do ultravioleta (UV), característica que amplia o potencial desses organismos como modelos para estudos relacionados à camuflagem, ao aposematismo e à comunicação intraespecífica (Caro, 2018).

Além da diversidade de padrões cromáticos observada entre as espécies, esses organismos apresentam expressiva plasticidade na coloração corporal, que pode ocorrer tanto em escalas temporais relativamente curtas quanto ao longo de períodos mais extensos. Essas alterações cromáticas têm sido associadas a diferentes funções ecológicas e comportamentais, incluindo comunicação intraespecífica, camuflagem e termorregulação (Detto et al., 2008; Stevens et al., 2013; Takeshita, 2019).

Diante de situações de risco, os chama-marés podem apresentar respostas adaptativas capazes de reduzir sua exposição à predação. Essas respostas incluem alterações comportamentais, como mudanças na atividade e no uso do ambiente (Christy, 1988; Endler, 1980; Ioannou & Krause, 2009), bem como modificações na coloração corporal (Detto et al., 2008). Dessa forma, a

plasticidade comportamental e cromática pode constituir um importante mecanismo de ajuste às condições ambientais, permitindo que os indivíduos conciliem demandas relacionadas à comunicação intraespecífica, à camuflagem e à redução do risco de predação.
O presente estudo busca responder como este comportamento, previamente descrito em diferentes espécies do grupo, ocorre dentro de indivíduos da espécie *Leptuca leptodactyla.* É previsto que o padrão de rápida mudança de coloração observada em caranguejos do gênero Uca (Detto et al., 2008) seja observado de forma semelhante nos organismos desta espécie, devido a proximidade taxonômica entre os grupos, para isto, avaliamos como a coloração de Leptuca leptodactyla altera ao longo do tempo,em duas populações distintas da espécie, levando em conta as diferenças entre machos e fêmeas e o local de ocorrência.

Metodologia

I. Local de estudo

Os dados foram coletados em duas populações de Leptuca leptodactyla encontradas em áreas de manguezais em Barra do Rio (BR) e no Centro de Tecnologia de Aquicultura (CTA/UFRN), ambos no município de Extremoz - Rio Grande do Norte, Brasil. Todos os experimentos foram realizados durante a maré baixa, durante os períodos de lua cheia e lua nova, entre as 09:00 e 14:00.

II. Coleta de dados

Foram observados 12(doze) indivíduos, sendo 6(seis) machos e 6(seis) fêmeas divididos da seguinte forma: 2 machos e 2 fêmeas em CTA e 4 machos e 4 fêmeas em BR. Os indivíduos foram localizados, coletados e colocados em um recipiente plástico com aproximadamente 10cm de diâmetro e 8cm de altura, dentro do recipiente foi adicionado um substrato retirado do próprio local.
Os indivíduos foram coletados com o menor tempo de contato possível, para reduzir estresse desnecessário, e fotografados utilizando uma câmera digital modelo Canon Rebel T2i, equipada com um tripé e um disparador. As fotos foram realizadas em uma área coberta, utilizada para uniformizar a iluminação ambiente, com o recipiente plástico e a tabela de cores. Cada indivíduo foi fotografado ao longo de 10 minutos, com intervalo de 20 segundos entre cada fotografia, totalizando 31 fotos por indivíduo(considerando a foto do tempo zero).

III. Análise dos dados

Utilizando o pacote micaToolBox (Troscianko; Stevens, 2015) do programa ImageJ foram coletados os valores de luminância através da captação quântica

dos receptores visuais utilizando os parâmetros de modelagem visual de Afruca tangeri, escolhido pela proximidade taxonômica entre as espécies. Essas informações foram medidas de um ponto central na carapaça em fêmeas, nos machos foram medidos o centro da carapaça e porção inicial da quela hipertrofiada,sendo considerados termos diferentes dentro do modelo, em ambos os casos também foi medido um ponto central no substrato.
As informações obtidas foram analisadas utilizando o programa RStudio com R 4.6.1 com os pacotes lme4 e lmerTest para ajuste de modelos lineares mistos (LMM) utilizando luminância como função fixa do tempo.
O script em R para ajuste dos modelos lineares mistos foi desenvolvido com auxílio de uma ferramenta de inteligência artificial (Claude, Anthropic), sob supervisão e validação dos autores.

Resultados e Discussões

Os valores de luminância variaram entre 0,101 e 0,343 nos grupos de CTA e entre 0,034 e 0,470 nos grupos de BR, com um desvio padrão consideravelmente maior em BR, os modelos lineares mistos evidenciaram um efeito significativo do tempo sobre a luminância dos indivíduos ($p<0,001$), onde os valores apresentam uma redução consistente ao longo do tempo, ou seja, os indivíduos foram escurecendo com o tempo(Figura 1). Houve uma exceção no grupo Fêmea-BR, com uma mudança bem menos significativa, com uma menor variação das medidas de luminância. Os testes também apresentaram resultados significativos quando adicionado os valores de luminância coletados do substrato. A inclinação do animal se apresenta estatisticamente diferente da inclinação do substrato(Figura 2). Além disso, também foi possível perceber que os indivíduos de CTA tem uma inclinação maior, ou seja, uma mudança mais rápida, em comparação aos indivíduos de BR.Na população CTA, o modelo linear misto revelou efeito negativo e altamente significativo do tempo sobre a luminância em fêmeas. Em machos, o efeito também foi significativo tanto na carapaça quanto na quela. Na população BR, o padrão foi mais heterogêneo. Em fêmeas, não houve evidência de efeito significativo do tempo sobre a luminância. Já em machos, o efeito permaneceu significativo tanto na carapaça quanto na quela.

Discussão

Detto et al. (2008), em seus estudos, demonstraram que *Uca (Tubuca) capricornis* é capaz de modificar rapidamente sua coloração após a captura, apresentando, em grande parte dos indivíduos, um processo progressivo de escurecimento durante os primeiros 20 minutos após o contato. De forma semelhante, a carapaça de Austruca lactea pode tornar-se significativamente mais escura em poucos minutos quando os indivíduos são submetidos a condições estressantes (Takeshita, 2019). Assim, o padrão identificado em *L. leptodactyla* reforça a existência de respostas cromáticas rápidas dentro da linhagem dos chama-marés, indicando que alterações na luminância podem ocorrer em escalas temporais menores do que aquelas associadas a

mudanças sazonais e/ou ontogenéticas.
O escurecimento observado pode estar relacionado à resposta fisiológica decorrente da captura, representando uma alteração das condições ambientais e comportamentais às quais os indivíduos estavam submetidos no ambiente natural e, portanto, pode funcionar como um estímulo estressor. Em U. capricornis, indivíduos submetidos à captura apresentaram alterações cromáticas rápidas, com tendência geral ao escurecimento, evidenciando que a mudança de coloração pode ocorrer como resposta a uma condição potencialmente adversa (Detto et al., 2008). Dessa maneira, os resultados encontrados para *L. leptodactyla* são compatíveis com a hipótese de que a redução da luminância observada após a captura esteja associada a uma resposta de curto prazo ao estresse. Além do estresse, outro fator que pode influenciar a mudança dos valores de luminância é a temperatura, a coloração mais escura tende a favorecer maior absorção de radiação, enquanto a coloração mais clara pode contribuir para reduzir o ganho térmico. Assim, as alterações observadas neste estudo podem representar uma resposta fisiológica associada ao conjunto de condições dos indivíduos após a captura, como a temperatura do ambiente não foi controlada não é possível desvincular sua influência sobre os resultados.

A diferença de queda observada entre as duas populações (CTA e BR) pode estar relacionada aos diferentes contextos populacionais, como temperatura e características do substrato, que podem modificar a intensidade da resposta ao estresse. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para comprovar esta relação. Outra característica que pode necessitar de estudos mais aprofundados é a menor variação observada nas fêmeas de BR. Diferenças entre os sexos na expressão e na plasticidade da coloração são descritas em outros chama-marés. Detto et al. (2008) aponta que mudanças cromáticas rápidas associadas à captura ocorreram com maior frequência em fêmeas de *U. capricornis*. O que difere dos resultados para *L. leptodactyla* apresentados neste trabalho. Estudos envolvendo outras espécies demonstram que machos e fêmeas podem diferir na intensidade de suas respostas cromáticas associadas à termorregulação (Kronstadt et al., 2013). Portanto, a menor variação encontrada pode ser uma característica do grupo ou uma limitação metodológica decorrente do tamanho amostral.
Os resultados sustentam a predição de que *L. leptodactyla* apresenta alterações rápidas na coloração corporal, evidenciadas pela redução progressiva da luminância ao longo do período de observação. A concordância desse padrão com alterações cromáticas rápidas previamente descritas em outros chama-marés sugere que essa capacidade pode representar uma característica funcionalmente relevante dentro da família Ocypodidae (Detto et al., 2008; Takeshita, 2019). Ao mesmo tempo, a diferença na velocidade de alteração entre as populações demonstra que a expressão dessa plasticidade pode variar, possivelmente em associação com características ambientais ou populacionais.

Conclusão

Com base nestas informações, podemos concluir que os resultados ampliam o conhecimento sobre a plasticidade cromática de *L. leptodactyla*, espécie para a qual estudos recentes já demonstram a relevância da coloração no comportamento sexual (Silva & Pessoa, 2026). A capacidade de modificar rapidamente a luminância pode representar um mecanismo que permite aos indivíduos ajustar suas características diante de diferentes condições ecológicas, conciliando demandas de comunicação, termorregulação e redução da conspicuidade. Entretanto, as limitações metodológicas do estudo como o tamanho amostral limitado e a presença de parâmetros não controlados, como a temperatura, limitam a determinação da função específica dessa alteração que exige experimentos que manipulem diretamente fatores como risco de predação, temperatura e características do substrato. Sendo assim, os resultados apresentados constituem uma evidência inicial de plasticidade de coloração de curto prazo em *L. leptodactyla* e fornecem uma base para investigações futuras sobre os mecanismos fisiológicos e as funções ecológicas dessa resposta.

Referências

BAGNARA, J. T.; HADLEY, M. E. Chromatophores and color change: the comparative physiology of animal pigmentation. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1973.

CARO, T. The functional significance of coloration in crabs. Biological Journal of the Linnean Society, v. 124, n. 1, p. 1-10, 2018. DOI: https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly021.

CHRISTY, J. H. Pillar function in the fiddler crab Uca beebei: refuge or signal? Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 23, n. 4, p. 233-239, 1988. DOI: https://doi.org/10.1007/BF00300351.

DETTO, T.; HEMMI, J. M.; BACKWELL, P. R. Y. Colouration and colour changes of the fiddler crab, Uca capricornis: a descriptive study. PLOS ONE, v. 3, n. 2, p. e1629, 2008. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001629.

DYSON, M. L.; PEREZ, D. M.; CURRAN, T.; McCULLOUGH, E. L.; BACKWELL, P. R. Y. The role of claw color in species recognition and mate choice in a fiddler crab. Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 74, artigo 116, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s00265-020-02899-w.

ENDLER, J. A. Natural selection on color patterns in Poecilia reticulata. Evolution, v. 34, n. 1, p. 76-91, 1980. DOI: https://doi.org/10.2307/2408316.

IOANNOU, C. C.; KRAUSE, J. Predator-prey interactions. In: MAGNHAGEN, C. et al. (org.). Fish behaviour. Enfield: Science Publishers, 2009.

KRONSTADT, S. M.; DARNELL, M. Z.; MUNGUIA, P. Background and temperature effects on Uca panacea color change. Marine Biology, v. 160, n. 6, p. 1373-1381, 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/s00227-013-2189-5.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: [inserir data de acesso].

SHIH, H.-T.; NG, P.; DAVIE, P.; SCHUBART, C.; TÜRKAY, M.; NADERLOO, R.; JONES, D.; LIU, M.-Y. Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Crustacea: Brachyura), based on phylogenetic relationships, with a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of Uca Leach, 1814, sensu lato and its subgenera. The Raffles Bulletin of Zoology, v. 64, p. 139-175, 2016.

SILVA, D.; PESSOA, D. Nuptial coloration in fiddler crabs as an indicator of reproductive quality. Behavioral Ecology, v. 37, 2026. DOI: https://doi.org/10.1093/beheco/arag038.

STEVENS, M.; RONG, C. P.; TODD, P. A. Colour change and camouflage in the horned ghost crab Ocypode ceratophthalmus. Biological Journal of the Linnean Society, v. 109, n. 2, p. 257-270, 2013. DOI: https://doi.org/10.1111/bij.12039.

TAKESHITA, F. Color changes of fiddler crab between seasons and under stressful conditions: patterns of changes in lightness differ between carapace and claw. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 511, p. 113-119, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.12.001.

TROSCIANKO, J.; STEVENS, M. Image calibration and analysis toolbox – a free software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. Methods in Ecology and Evolution, v. 6, n. 11, p. 1320-1331, 2015. DOI: https://doi.org/10.1111/2041-210X.12439.

TSANG, L. M.; SCHUBART, C. D.; AHYONG, S. T.; LAI, J. C. Y.; AU, E. Y. C.; CHAN, T.-Y.; NG, P. K. L.; CHU, K. H. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. Molecular Biology and Evolution, v. 31, n. 5, p. 1173-1187, 2014. DOI: https://doi.org/10.1093/molbev/msu068.

Anexos



Figura 1



Figura 2

CÓDIGO: SB0144

AUTOR: HERICK JOSE CUNHA CHAVES

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Efeitos deletérios da amitriptilina sobre parâmetros espermáticos de ratos e o papel protetor do sulfato de zinco.

Resumo

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico cujo uso pode estar associado a efeitos adversos sobre a função reprodutiva masculina. O presente estudo avaliou os efeitos do fármaco sobre parâmetros espermáticos testiculares e epididimários e investigou o possível efeito protetor do sulfato de zinco. Ratos Wistar foram tratados, via oral, durante 30 dias com amitriptilina (5 mg/kg), sulfato de zinco (3 mg/kg), associação de ambos ou veículo (grupo controle). Ao final do tratamento, foram avaliados o número de espermátides, a produção diária de espermatozóides (PDE), o número de espermatozóides nas diferentes regiões do epidídimo e o tempo de trânsito espermático no epidídimo. O tratamento com amitriptilina reduziu o número de espermátides, a PDE e o número de espermatozóides na cabeça/corpo do epidídimo, além de prolongar o tempo de trânsito espermático. Em contraste, a associação de amitriptilina com sulfato de zinco não apresentou alterações em relação ao grupo controle nos parâmetros avaliados. O tratamento isolado com zinco também não promoveu alterações significativas. Esses resultados preliminares sugerem que a amitriptilina pode comprometer a reprodução masculina, enquanto a associação com zinco pode atenuar esses efeitos. Entretanto, o reduzido número amostral limita a interpretação dos achados. O aumento da amostragem e análises adicionais de qualidade espermática serão importantes para confirmar os resultados e esclarecer o possível efeito protetor do zinco.

Palavras-chave: Amitriptilina; Zinco; Reprodução masculina; Espermatogênese; Epidídimo

TITLE: Deleterious effects of amitriptyline on rat sperm parameters and the protective role of zinc sulfate.

Abstract

Amitriptyline is a tricyclic antidepressant whose use may be associated with adverse effects on male reproductive function. This study evaluated the drug's effects on testicular and epididymal sperm parameters and investigated the

potential protective effect of zinc sulfate. Wistar rats were orally treated for 30 days with amitriptyline (5 mg/kg), zinc sulfate (3 mg/kg), a combination of both, or vehicle (control group). At the end of treatment, the number of spermatids, daily sperm production (DSP), sperm number in different epididymal regions, and sperm transit time were evaluated. Amitriptyline treatment reduced the number of spermatids, DSP, and sperm number in the epididymal caput/corpus, while also prolonging sperm transit time. In contrast, concomitant treatment with amitriptyline and zinc sulfate did not result in significant changes compared with the control group for the evaluated parameters. Treatment with zinc alone also did not result in significant changes. These preliminary results suggest that amitriptyline may impair male reproduction, whereas the combination with zinc may attenuate these effects. However, the small sample size limits the interpretation of the findings. Increasing the sample size and incorporating additional analyses of sperm quality will be important to confirm these results and further investigate the potential protective effect of zinc against amitriptyline-induced reproductive alterations.

Keywords: Amitriptyline; Zinc; Male reproduction; Spermatogenesis; Epididymis.

Introdução

Certos fármacos utilizados como medicamentos podem afetar negativamente a fertilidade masculina. Atualmente, esses efeitos deletérios têm recebido crescente atenção, considerando o aumento do consumo de medicamentos, inclusive entre homens em idade reprodutiva. Paralelamente, observa-se um aumento na frequência de problemas reprodutivos masculinos, fenômeno que pode estar, ao menos em parte, relacionado ao uso frequente e prolongado de medicamentos (Drobnis & Nangia, 2017). Os fármacos podem afetar a fertilidade masculina por diversos mecanismos, e múltiplos alvos podem estar envolvidos. Os antidepressivos, por exemplo, são uma importante classe de fármacos que apresentam efeitos negativos sobre a fertilidade masculina, sendo a maioria deles relacionados a sua interação com alvos farmacológicos diferentes daqueles responsáveis por seus efeitos clínicos (Drobnis & Nangia, 2017; Pratt et al., 2017; Semet et al., 2017). Com base nisso, é descrito que a amitriptilina, um antidepressivo tricíclico, foi capaz de alterar a qualidade do sêmen de humanos. Em modelos animais, por sua vez, a administração oral de amitriptilina reduziu a contagem de espermatozoides e a morfologia normal, aumentando ainda a aneuploidia em espermatócitos de maneira dose dependente (Drobnis & Nangia, 2017). O epidídimo é um importante órgão relacionado à maturação e transporte de espermatozoides. Estas funções estão relacionadas a atividade motora da musculatura lisa do ducto epididimário, a qual é dependente de cálcio extracelular, sendo modulada por fatores locais, como histamina, além dos fatores hormonais (testosterona) e neuronais (acetilcolina, noradrenalina) (Elfgen et al., 2018). É também descrito que alterações na atividade motora do ducto epididimário induzida por fármacos pode ter consequências negativas sobre parâmetros espermáticos (Bellentani et al., 2011; Bezerra et al., 2019; Borges et al., 2021; Fernandez et al., 2008; Martins et al., 2021; Perobelli et al., 2012; Silva et al., 2014). Assim, considerando que a amitriptilina possui ações anticolinérgicas, antiadrenérgicas e anti-histamínicas (Mostafalou &

Mohammadi, 2023), podemos conjecturar que este fármaco pode alterar a atividade motora do ducto epididimário, gerando alterações quantitativas e qualitativas e, por conseguinte, produzindo efeitos antifertilidade. O sulfato de zinco é empregado rotineiramente no tratamento coadjuvante nos casos de diarreia. Além disso, pode ser encontrado em suplementos vitamínicos. O zinco no sêmen está diretamente relacionado a parâmetros normais dos espermatozoides. Parte destas ações pode estar vinculada a capacidade antioxidante deste elemento. O zinco também parece ser essencial para a espermatogênese e o crescimento testicular (Mousavi Esfiokhi et al., 2023). Dados da literatura demonstram uma ação protetora contra danos testiculares e espermáticos promovidos por diferentes fármacos. Por exemplo, o tratamento com ciclofosfamida (quimioterápico) em ratos reduziu o peso corporal e testicular, parâmetros espermáticos, o número de células espermatogênicas, a testosterona sérica e aumentou significativamente o estresse oxidativo, as anormalidades da cabeça do espermatozóide e o dano ao seu DNA. A suplementação de zinco 1, 3, 10 mg/kg/dia por 3 semanas foi capaz de prevenir todos estes efeitos (Maremanda et al., 2014). Desta forma, este estudo será conduzido com o intuito de avaliarmos os efeitos da amitriptilina sobre parâmetros espermáticos. Ademais, utilizaremos o sulfato de zinco como estratégia para a prevenção de possíveis efeitos deste fármaco. Este trabalho se faz relevante pois pode preencher lacunas relacionadas aos efeitos dos antidepressivos sobre a saúde reprodutiva masculina, uma vez que tais agentes são comumente usados por adultos com depressão em idade reprodutiva (Kanner & Bicchi, 2022). Assim, pode-se criar estratégias para a prevenção de possíveis efeitos adversos sobre a fertilidade masculina ou melhor direcionamento terapêutico.

Metodologia

Animais: Foram utilizados ratos Wistar, com 3 a 4 meses de idade, pesando 300-400g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande Norte. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia (DBF), alojados em gaiolas-viveiro (5 animais/gaiola), com livre acesso a água e comida (Ração Purina®, Labina), ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (claro, das 6:00 às 18:00) e temperatura controlada (23°C ± 1°C). As gaiolas-viveiro foram forradas com maravalha e o processo de higienização das mesmas (trocas) foi realizado a cada dois dias. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Lei no 11.794 de 08/10/2008 (Lei Arouca) e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo 050/2025).

Tratamento, grupos experimentais e eutanásia dos animais: Os ratos foram separados aleatoriamente em grupos experimentais e tratados oralmente (via gavagem) por 30 dias com amitriptilina 5 mg/kg em conjunto ou não com de sulfato de zinco 3 mg/kg. Houve também um grupo controle para cada fármaco que recebeu apenas veículo. Ao fim do tratamento, os animais tratados e seus respectivos controles foram eutanasiados por decapitação e os epidídimos e os

testículos foram isolados, pesados e levados para os procedimentos experimentais descritos a seguir.

Determinação de parâmetros espermáticos: Os testículos e os epidídimos dos animais dos grupos experimentais foram isolados e processados para a determinação da produção diária, trânsito espermático e concentração de espermatozoides. Para a avaliação da produção diária de espermatozóides, o testículo dos animais tratados ou controle foram decapsulados, pesados e homogeneizados em 5 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%, seguido de sonicação por 30s. Por conseguinte, foi realizada uma diluição 10 vezes e uma amostra foi transferida para uma câmara de Neubauer para contagem das espermátides em estágio 19 (resistentes a homogeneização) (quatro campos por animal). Para o cálculo da produção diária de espermatozóides, o número de espermátides (por testículo) será dividido por 6,1 (se refere ao número de dias que estas espermátides estão presentes no epitélio seminífero). Por outro lado, o epidídimo dos animais tratados ou controle foram separados em duas partes: cabeça/corpo e cauda do epidídimo. Em seguida, cada região do epidídimo foi homogeneizada e o número de espermatozoides determinado como descrito para as espermátides. O tempo de trânsito espermático pelo epidídimo foi calculado dividindo o número de espermatozóides em cada porção do epidídimo pela respectiva produção diária de espermatozóides.

Análise dos dados: Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A Análise de variância (ANOVA) unidirecional (one–way) seguida pelo teste de Bonferroni foi usada na análise estatística entre os grupos. Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

A Tabela 1 demonstra que o tratamento com amitriptilina reduziu o número de espermátides, a produção diária de espermatozóides e o número de espermatozóides na cabeça/corpo do epidídimo, além de prolongar o tempo de trânsito espermático nesta região. Em contraste, os animais tratados concomitantemente com amitriptilina e zinco não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle para esses parâmetros, sugerindo que a suplementação com zinco pode ter atenuado as alterações induzidas pela amitriptilina. O tratamento isolado com zinco, por sua vez, não promoveu alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados obtidos reforçam a possibilidade de que a amitriptilina exerça efeitos deletérios sobre a função reprodutiva masculina. A redução do número de espermátides e da produção diária de espermatozóides observada após o tratamento sugere interferência do fármaco na espermatogênese. Esse achado é consistente com evidências anteriores que associam a exposição à amitriptilina a alterações nos parâmetros espermáticos (Drobnis & Nangia, 2017). Além dos efeitos sobre a espermatogênese, a amitriptilina também promoveu alterações relacionadas à dinâmica dos espermatozoides no epidídimo, caracterizadas pela redução do número de espermatozóides na cabeça/corpo e pelo prolongamento do tempo de trânsito espermático. O epidídimo desempenha papel fundamental na maturação, armazenamento e transporte dos espermatozoides, processos que

dependem da atividade contrátil da musculatura lisa do ducto epididimário (Elfgen et al., 2018). Dessa forma, alterações na motilidade desse ducto podem interferir no transporte e armazenamento dos espermatozoides e, consequentemente, comprometer a função reprodutiva. Estudos experimentais demonstram que alterações farmacologicamente induzidas na atividade contrátil do epidídimo podem estar associadas a modificações importantes nos parâmetros espermáticos (Fernandez et al., 2008; Bellentani et al., 2011; Perobelli et al., 2012; Silva et al., 2014; Bezerra et al., 2019; Borges et al., 2021; Martins et al., 2021). Nesse contexto, as propriedades farmacológicas off-target da amitriptilina, incluindo suas ações anticolinérgica, antiadrenérgica e anti-histamínica (Mostafalou & Mohammadi, 2023), podem contribuir para alterações na regulação da musculatura lisa epididimária. Um aspecto particularmente relevante foi a ausência de diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com amitriptilina associada ao zinco. Esse resultado pode indicar uma possível ação atenuadora do zinco sobre os efeitos reprodutivos induzidos pela amitriptilina. O zinco exerce funções importantes na reprodução masculina, participando da espermatogênese e da manutenção da estrutura e função dos espermatozóides, além de apresentar propriedades relacionadas à defesa antioxidante (Mousavi Esfiokhi et al., 2023). Embora os mecanismos envolvidos na possível proteção observada no presente estudo ainda não estejam estabelecidos, achados experimentais anteriores dão suporte à hipótese de que o zinco possa reduzir danos reprodutivos induzidos por fármacos (Maremanda et al., 2014). É importante destacar, entretanto, que esses resultados devem ser interpretados como dados preliminares, uma vez que o número de animais analisados ainda é reduzido. O aumento do tamanho amostral permitirá maior robustez estatística e melhor avaliação da consistência dos efeitos observados. Além disso, análises adicionais serão incorporadas ao estudo, especialmente aquelas relacionadas à qualidade espermática, permitindo avaliar de maneira mais abrangente os possíveis efeitos da amitriptilina e a capacidade do zinco de atenuá-los. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento sugerem um possível efeito protetor do zinco, mas estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese e esclarecer os mecanismos envolvidos.

Conclusão

Os resultados preliminares indicam que a amitriptilina compromete parâmetros relacionados à espermatogênese e à dinâmica epididimária. A associação com zinco parece atenuar essas alterações, sugerindo um possível efeito protetor, enquanto o zinco isoladamente não promoveu alterações. O aumento do número amostral e a inclusão de análises adicionais da qualidade espermática serão necessários para confirmar esses achados.

Referências

Bellentani, F. F., Fernandes, G. S., Perobelli, J. E., Pacini, E. S., Kiguti, L. R., Pupo, A. S., & Kempinas, W. D. (2011). Acceleration of sperm transit time and

reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. J Androl, 32(6), 718–724. https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013466

Bezerra, M. S., Martins, A. B. M., Trajano, F. M. G., Pontes, T. H. de A., Gomes, L. T. da C., Gavioli, E. C., & Silva Junior, E. D. da. (2019). Fluoxetine and sertraline effects on rat distal cauda epididymis contraction, sperm count and sperm transit time trough epididymis. European Journal of Pharmacology, 865, 172774. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172774

Borges, C. S., Kiguti, L. R. A., Pupo, A. S., & Kempinas, W. G. (2021). In Vitro Contraction of Isolated Cauda Epididymal Duct Smooth Muscle as a Complimentary Approach to Physiological, Pathological, Toxicological, and Pharmacological Studies on Epididymal Function. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2240, 65–76. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1091-6_6

Drobnis, E. Z., & Nangia, A. K. (2017). Impacts of Medications on Male Fertility. In Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 1034). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69535-8

Elfgen, V., Mietens, A., Mewe, M., Hau, T., & Middendorff, R. (2018). Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. Reproduction, 156(4), R125–R141. https://doi.org/10.1530/REP-17-0754

Fernandez, C. D., Porto, E. M., Arena, A. C., & Kempinas Wde, G. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. Int J Androl, 31(4), 427–437. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x

Kanner, A. M., & Bicchi, M. M. (2022). Antiseizure Medications for Adults With Epilepsy: A Review. JAMA, 327(13), 1269–1281. https://doi.org/10.1001/JAMA.2022.3880

Maremanda, K. P., Khan, S., & Jena, G. (2014). Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: Involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 445(3), 591–596. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.02.055

Martins, A. B. M., Bezerra, M. S., Costa Gomes, L. T., Trajano, F. M. G., Dantas, P. B., Sena, M. O., Gavioli, E. C., & Silva Junior, E. D. (2021). Effects of dipyrone and acetylsalicylic acid on contractions of distal cauda epididymis duct, serum testosterone and sperm count in rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 129(3), 183–195. https://doi.org/10.1111/bcpt.13633

Mostafalou, S., & Mohammadi, P. (2023). Tricyclic Antidepressants. Encyclopedia of Toxicology, Fourth Edition: Volume 1-9, 9, V9-597-V9-607. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00947-7

Mousavi Esfiokhi, S. H., Norouzian, M. A., & Najafi, A. (2023). Effect of different sources of dietary zinc on sperm quality and oxidative parameters. Frontiers in Veterinary Science, 10, 1134244. https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1134244/BIBTEX

Perobelli, J. E., Alves, T. R., de Toledo, F. C., Fernandez, C. D., Anselmo-Franci, J. A., Klinefelter, G. R., & Kempinas Wde, G. (2012). Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. Reprod Toxicol, 33(3), 308–315. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.12.011

Pratt, L. A., Brody, D. J., & Gu, Q. (2017). Antidepressant Use Among Persons Aged 12 and Over:United States,2011-2014. NCHS Data Brief, (283), 1–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29155679

Semet, M., Paci, M., Saïas-Magnan, J., Metzler-Guillemain, C., Boissier, R., Lejeune, H., & Perrin, J. (2017). The impact of drugs on male fertility: a review. Andrology, 5(4), 640–663. https://doi.org/10.1111/andr.12366

Silva, E. J., Vendramini, V., Restelli, A., Bertolla, R. P., Kempinas, W. G., & Avellar, M. C. (2014). Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: insights into the adrenal control of male reproduction. Andrology, 2(6), 835–846. https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00228.x

Anexos



Tabela 1 – Parâmetros espermáticos quantitativos de ratos expostos ao tratamento oral (via gavagem) com amitriptilina 5 mg/kg ou zinco 3 mg/kg ou veículo livre de fármaco (controle) por 30 dias.

CÓDIGO: SB0186

AUTOR: HELLEN CAROLINY SANTOS VALENTIM LOPES

COAUTOR: EDLA MAIRA NASCIMENTO DA SILVA DE SOUZA

COAUTOR: CAMILLA DE OLIVEIRA CAVALCANTI

ORIENTADOR: ELIANE MARINHO SORIANO

TÍTULO: Impactos das ondas de calor marinhas em macroalgas: uma revisão dos efeitos fisiológicos, bioquímicos e ecológicos

Resumo

As ondas de calor marinhas (Marine Heatwaves – MHWs) têm se intensificado nas últimas décadas e representam uma ameaça crescente aos ecossistemas costeiros. Esta revisão bibliográfica teve como objetivo sintetizar o conhecimento científico sobre os efeitos das MHWs em macroalgas, com foco nas respostas fisiológicas, bioquímicas e ecológicas. A metodologia consistiu na análise de estudos publicados sobre ondas de calor em diferentes espécies de macroalgas, considerando variáveis como crescimento, biomassa, fotossíntese, estresse oxidativo e alterações ecológicas. Os resultados indicam que as MHWs reduzem a eficiência fotossintética, o crescimento e a assimilação de nutrientes, além de aumentarem a produção de espécies reativas de oxigênio e os danos celulares. Em nível ecológico, observam-se perda de biomassa, alterações na estrutura das comunidades e impactos sobre espécies formadoras de habitat. Apesar disso, algumas macroalgas apresentam mecanismos de aclimatação, como maior produção de antioxidantes e osmólitos, que contribuem no aumento da tolerância térmica. Conclui-se que os efeitos das ondas de calor marinhas sobre as macroalgas dependem da intensidade e duração dos eventos térmicos e da capacidade adaptativa das espécies, mas a intensificação desses eventos associada às mudanças climáticas tende a ampliar seus impactos sobre os ecossistemas costeiros.

Palavras-chave: Ondas de calor marinhas. Macroalgas. Estresse térmico.

TITLE: Impacts of marine heatwaves on macroalgae: a review of physiological, biochemical, and ecological effects

Abstract

Marine Heatwaves (MHWs) have intensified over recent decades and represent an increasing threat to coastal ecosystems. This literature review aimed to synthesize current scientific knowledge on the effects of MHWs on macroalgae, focusing on physiological, biochemical, and ecological responses. The methodology consisted of analyzing published studies on heatwave events affecting different macroalgal species, considering variables such as growth, biomass, photosynthesis, oxidative stress, and ecological changes. The results indicate that MHWs reduce photosynthetic efficiency, growth, and nutrient assimilation, while increasing the production of reactive oxygen species and cellular damage. At the ecological level, biomass loss, alterations in community structure, and impacts on habitat-forming species have been frequently reported. Nevertheless, some macroalgae exhibit acclimation mechanisms, including enhanced production of antioxidants and osmolytes, which contribute to increased thermal tolerance. It is concluded that the effects of marine heatwaves on macroalgae depend on the intensity and duration of thermal events, as well as on the adaptive capacity of species. However, the intensification of these events associated with climate change is likely to amplify their impacts on coastal ecosystems.

Keywords: Marine Heatwaves. Macroalgae. Thermal Stress.

Introdução

As mudanças climáticas têm intensificado a ocorrência de eventos extremos nos oceanos, dentre os quais as ondas de calor marinhas (Marine Heatwaves – MHWs) se destacam pelo aumento de sua frequência, duração e intensidade nas últimas décadas (Oliver et al., 2018). Esses eventos são caracterizados por períodos prolongados de temperaturas anormalmente elevadas da superfície do mar em relação à média histórica local, podendo provocar alterações significativas nos processos biológicos, ecológicos e biogeoquímicos dos ecossistemas marinhos (Hobday et al., 2016; Smale et al., 2019). A crescente incidência das MHWs tem despertado interesse científico devido aos seus impactos sobre organismos marinhos e aos potenciais efeitos em cascata sobre a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas costeiros.

As macroalgas constituem componentes fundamentais dos ambientes costeiros, desempenhando papel essencial na produção primária, na ciclagem de nutrientes, no sequestro de carbono e na provisão de habitat para diversas espécies marinhas. Além de sua importância ecológica, esses organismos contribuem para a manutenção da biodiversidade e contribuem para a estabilidade e resiliência dos ecossistemas bentônicos (Steneck et al., 2002;

Krause-Jensen & Duarte, 2016; Marinho-Soriano & Carneiro, 2021). Entretanto, por serem organismos sésseis, as macroalgas apresentam capacidade limitada de escapar de condições ambientais adversas, tornando-se particularmente vulneráveis às variações extremas de temperatura associadas às ondas de calor marinhas.

Diversos estudos têm demonstrado que as MHWs afetam diretamente a fisiologia e a bioquímica das macroalgas, resultando em reduções na eficiência fotossintética, crescimento e assimilação de nutrientes, além de promoverem estresse oxidativo e danos celulares (Gouvêa et al., 2017; Borburema et al., 2022; Jiang et al., 2022; Zuo et al. 2023). Em escala ecológica, esses impactos podem levar à perda de biomassa, alterações na estrutura das comunidades, redução da biodiversidade e comprometimento dos serviços ecossistêmicos fornecidos por espécies formadoras de habitat (Wernberg et al., 2016; Thomsen et al., 2019; Cavanaugh et al., 2019). Apesar desses efeitos negativos, algumas espécies apresentam mecanismos de resistência e aclimatação, como o aumento da produção de pigmentos fotossintéticos, antioxidantes e osmólitos, evidenciando respostas diferenciadas ao estresse térmico (Gouvêa et al., 2017; Borburema et al., 2022; Celis-Plá et al., 2022; Saha et al., 2020; Fabbrizzi et al., 2023).

Diante do aumento da temperatura dos oceanos e da intensificação dos eventos extremos associados às mudanças climáticas, torna-se fundamental compreender como as macroalgas respondem às ondas de calor marinhas. A síntese do conhecimento disponível permite identificar padrões de vulnerabilidade e resiliência entre espécies e populações, contribuindo para previsões mais robustas sobre os impactos futuros do aquecimento oceânico e para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo dos habitats costeiros. Nesse contexto e em consonância com alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil (ODS), proposto pela Organização das Nações Unidas (ONU), a “ODS 13 - Ação contra a mudança global do clima” e a “ODS 14 - Vida na água”, esta revisão bibliográfica teve como objetivo reunir e sintetizar o conhecimento científico sobre os efeitos das ondas de calor em macroalgas marinhas, com enfoque nas respostas fisiológicas, bioquímicas e ecológicas, bem como nos mecanismos de resistência, aclimatação e resiliência apresentados por diferentes espécies frente ao estresse térmico.

Metodologia

Este estudo consistiu em uma revisão bibliográfica de caráter qualitativo e descritivo sobre o impacto das ondas de calor marinhas nas macroalgas. A busca bibliográfica foi realizada considerando 2015 a 2026 nas bases SciELO, Portal de Periódicos CAPES, ScienceDirect, ResearchGate e PubMed. Os descritores

utilizados foram em inglês combinados por meio dos operadores booleanos AND e OR, incluindo os termos: “heatwave”, “macroalgae”, “seaweed”, “climate change”, “ocean”, “stress”, “physiological”, “photosynthesis”, “temperature” e “thermal”. Para o estudo foram analisados 92 documentos científicos, dos quais 54 artigos foram considerados nos resultados. Posteriormente os dados foram organizados em planilhas eletrônicas e agrupados em categorias temáticas, subsidiando a elaboração de tabelas, gráficos, mapas de distribuição geográfica e nuvens de palavras. Os dados extraídos incluíram informações sobre espécies, respostas fisiológicas e condições experimentais.

Resultados e Discussões

A análise dos 54 estudos selecionados revelou predominância de abordagens experimentais conduzidas em laboratório, que representaram 66,67% das publicações avaliadas (36 estudos). Esse resultado evidencia a ampla utilização de condições controladas para investigar os efeitos fisiológicos, bioquímicos e ecológicos das macroalgas, permitindo maior precisão na avaliação das respostas aos diferentes fatores ambientais. Os estudos baseados em modelagem ecológica corresponderam a 5,56% do total (3 estudos), demonstrando pouco enfoque em ferramentas preditivas para avaliar cenários de distribuição, adaptação e vulnerabilidade das espécies frente às mudanças ambientais. Por sua vez, os estudos de campo representaram 27,78% das publicações analisadas (15 estudos), fornecendo informações essenciais sobre o comportamento das macroalgas em condições naturais e contribuindo para a validação dos resultados obtidos em laboratório (Tabela 1).

A predominância de estudos laboratoriais sugere que a compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos das macroalgas ainda constitui uma prioridade na área, enquanto a menor proporção de estudos de campo reflete as dificuldades logísticas e operacionais associadas à coleta de dados em ambientes naturais. Por outro lado, a participação das modelagens ecológicas indica uma tendência recente de integração entre dados experimentais e ferramentas preditivas para a compreensão dos efeitos das mudanças ambientais sobre esses organismos (Gouvêa et al., 2017; Filbee-Dexter et al., 2020; Artana et al., 2025).

Com o objetivo de identificar os principais temas abordados sobre ondas de calor marinhas e macroalgas, foi elaborada uma nuvem de palavras a partir das palavras-chave e termos mais frequentes encontrados nos estudos selecionados. A representação gráfica permite visualizar os tópicos predominantes e suas relações com os impactos fisiológicos, ecológicos e ambientais associados aos eventos extremos de aquecimento oceânico.

A nuvem de palavras (Figura 1), evidencia que as pesquisas sobre ondas de calor marinhas em macroalgas concentram-se principalmente nos efeitos do aumento da temperatura oceânica, refletidos pela predominância dos termos marine, temperature, MHWs e heatwaves. Destacam-se ainda palavras relacionadas às respostas fisiológicas das macroalgas, como *physiological, photosynthesis*, *stress, tolerance, growth e resistance*, indicando forte enfoque nos mecanismos de estresse térmico, aclimatação e desempenho metabólico. A frequência dos termos *climate, global, warming* e *ocean* demonstra que esses estudos estão inseridos no contexto das mudanças climáticas globais, enquanto palavras como *ecosystems, populations, foundation* e *biodiversity* evidenciam o interesse pelos impactos ecológicos das MHWs. Além disso, a presença de termos como *kelps, seaweeds, foundation* e *macroalgae* ressalta a importância de espécies formadoras de habitat, ao passo que palavras relacionadas a fatores ambientais, como *salinity, nutrient, nitrogen, carbon* e CO_2, sugerem a investigação de efeitos interativos entre o aquecimento oceânico e outras mudanças ambientais. Em conjunto, os resultados indicam que a literatura tem priorizado a compreensão das respostas fisiológicas e ecológicas das macroalgas frente ao aquecimento extremo dos oceanos.

A análise dos estudos selecionados revelou predominância do uso de macroalgas pardas pertencentes ao grupo Ochrophyta, que representaram 75,3% das espécies investigadas, seguidas pelas macroalgas vermelhas do grupo Rhodophyta, com 23,5% dos registros, e pelas macroalgas verdes do grupo Chlorophyta, que corresponderam a apenas 1,2% do total analisado (Figura 2). Entre as algas pardas, os gêneros mais frequentemente reportados foram Ecklonia radiata, Durvillaea spp. e Saccharina latissima (Thomsen et al., 2019; Wynn et al, 2025; Ding et al., 2025). No grupo das Rhodophytas, destacaram-se os gêneros Bostrychia spp., Hypnea e Gracilaria spp. (Borburema et al., 2022; Nauer et al., 2022; 2026; Seo et al., 2026), enquanto as Chlorophyta foram representadas exclusivamente pelo gênero Ulva spp. (Jiang et al., 2022). A predominância das macroalgas pardas pode estar associada à maior concentração de estudos desenvolvidos em regiões temperadas e frias, especialmente na Europa e Oceania (Figura 3), onde esses organismos apresentam elevada abundância e biomassa natural.

A análise da distribuição geográfica dos estudos sobre ondas de calor marinhas e macroalgas evidencia uma concentração das pesquisas em regiões temperadas e subtropicais do planeta. A Europa apresentou a maior representatividade, reunindo 29,63% dos estudos analisados, seguida pela Oceania (25,93%), região reconhecida pela elevada ocorrência de eventos extremos de aquecimento oceânico e pela presença de extensas florestas de kelps. A América do Sul contribuiu com 18,52% das publicações, enquanto a América do Norte representou 14,81% do total. A Ásia apresentou participação mais modesta (7,41%), e a África concentrou apenas 3,70% dos estudos. Não

foram identificadas pesquisas realizadas na Antártica dentro do que foi avaliado. Esses resultados demonstram uma distribuição desigual, com predominância de investigações realizadas em áreas reconhecidas pela ocorrência de macroalgas formadoras de habitat, como as costas do Pacífico Norte, Austrália, Nova Zelândia e Atlântico Norte.

De maneira geral, as ondas de calor marinhas afetam diversos aspectos da biologia das macroalgas, desencadeando respostas fisiológicas, bioquímicas e ecológicas que variam conforme a intensidade do estresse térmico, a duração do evento e a tolerância das espécies envolvidas. Como demonstrado na tabela 2, a seguir, as ondas de calor marinhas têm sido reconhecidas como importantes agentes de alteração do funcionamento fisiológico das macroalgas, uma vez que o aumento abrupto da temperatura frequentemente excede os limites de tolerância térmica dessas espécies.

Como consequência, observa-se redução da eficiência fotossintética, da taxa de crescimento relativo e da capacidade de assimilação de nutrientes, comprometendo processos essenciais para a manutenção do metabolismo e da produtividade primária (Gouvêa et al., 2017; Rendina et al., 2019; Saha et al., 2020). Esses efeitos são frequentemente acompanhados por desequilíbrios metabólicos que favorecem a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo, danos celulares e comprometimento da integridade fisiológica dos organismos (Borburema et al., 2025; Saha et al., 2020; Fabbrizzi et al., 2023).

A fotossíntese destaca-se como um dos mais sensíveis ao estresse térmico. Diversos estudos relataram reduções significativas do rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) e da taxa de transporte de elétrons sob condições de aquecimento extremo (Gouvêa et al., 2017; Rendina et al., 2019; Borburema et al., 2025). Tais respostas indicam que as MHWs afetam diretamente os mecanismos de captura e conversão de energia luminosa, reduzindo a capacidade fotossintética e, consequentemente, a disponibilidade de energia para crescimento e reprodução. Em algas calcárias como *Corallina officinalis*, a combinação entre aquecimento gradual dos oceanos e ondas de calor marinhas pode comprometer processos fisiológicos essenciais, incluindo o metabolismo respiratório e mecanismos relacionados à manutenção da calcificação (Rendina et al., 2019). Esses resultados sugerem que organismos calcificadores podem apresentar maior vulnerabilidade diante dos cenários futuros de mudanças climáticas.

Os efeitos fisiológicos observados refletem-se diretamente no desempenho ecológico das macroalgas. A redução do crescimento e da biomassa constitui

uma das respostas mais recorrentes, especialmente em espécies formadoras de habitat, nas quais eventos térmicos repetidos promovem diminuição do crescimento, aumento da deterioração tecidual e perda de biomassa (Cavanaugh et al. 2019; Wynn et al. 2025). Como essas espécies desempenham papel fundamental na estruturação de comunidades costeiras, sua degradação pode desencadear alterações na disponibilidade de abrigo, alimento e substrato para diversos organismos associados. Em situações mais severas, quando os limiares fisiológicos são ultrapassados, registram-se necrose tecidual, branqueamento, insucesso reprodutivo e eventos de mortalidade em massa (Bennett et al. 2015; Musrri et al. 2026), evidenciando o potencial das MHWs para promover mudanças significativas na composição e no funcionamento dos ecossistemas marinhos.

Apesar dos impactos predominantemente negativos, diferentes estudos demonstram que algumas espécies possuem mecanismos de resistência e aclimatação capazes de mitigar parcialmente os efeitos do aquecimento. O aumento da síntese de pigmentos fotossintéticos, compostos antioxidantes e osmólitos representa uma importante estratégia de defesa celular, contribuindo para a neutralização do estresse oxidativo e para a manutenção da atividade metabólica sob temperaturas elevadas (Borburema et al. 2022; Nauer et al., 2022; Jiang et al., 2022; Fabbrizzi et al. 2023). Além disso, a resistência ao calor varia consideravelmente entre espécies e populações. *Ecklonia radiata*, por exemplo, apresentou capacidade de resistência a eventos térmicos sucessivos, mantendo parte de seu desempenho fisiológico mesmo após exposições repetidas ao calor, embora com custos ecológicos de longo prazo associados à redução do crescimento e ao aumento da erosão tecidual (Wynn et al., 2025). Por outro lado, fatores como sazonalidade, disponibilidade de nutrientes e origem geográfica das populações influenciam significativamente a magnitude das respostas observadas (Jiang et al. 2022; Nauer et al. 2022; Borburema et al. 2025).

De modo geral, os estudos analisados indicam que os efeitos das ondas de calor marinhas sobre as macroalgas dependem da intensidade e duração dos eventos térmicos, bem como das características intrínsecas de cada espécie. Embora mecanismos de aclimatação possam aumentar a resistência ao estresse térmico em determinadas condições, a recorrência e a intensificação das MHWs associadas às mudanças climáticas globais tendem a ampliar os impactos fisiológicos e ecológicos, representando uma ameaça crescente à persistência das macroalgas e aos serviços ecossistêmicos fornecidos por esses organismos nos ambientes costeiros.

Conclusão

Os resultados da pesquisa evidenciam que as ondas de calor marinhas representam um fator de estresse preocupante para as macroalgas, impactando em sua sobrevivência e consequentemente, na manutenção de ecossistemas costeiros. A literatura analisada indica que os efeitos mais recorrentes envolvem a redução da eficiência fotossintética, do crescimento e da biomassa, além do aumento do estresse oxidativo e de alterações na estrutura das comunidades marinhas. Por mais que algumas espécies apresentem mecanismos de aclimatação e resistência, como maior produção de pigmentos e antioxidantes, essas respostas variam conforme a espécie, a população, a sazonalidade e a intensidade dos eventos térmicos. Além disso, a predominância de estudos laboratoriais, de macroalgas marrons e de pesquisas concentradas em regiões como Europa e Oceania demonstra a necessidade de ampliar estudos em campo e em áreas tropicais e subtropicais, especialmente diante da intensificação das mudanças climáticas. Assim, compreender as respostas das macroalgas às ondas de calor marinhas se torna fundamental para prever impactos futuros, subsidiar estratégias de conservação e contribuir para o manejo dos ecossistemas litorâneos.

Referências

Artana, C., Capitani, L., Santos Garcia, G., Angelini, R., Coll, M., 2025. Food web trophic control modulates tropical Atlantic reef ecosystems response to marine heat wave intensity and duration. Journal of Animal Ecology 94, 1492–1506. https://doi.org/10.1111/1365-2656.14107

Bennett, S., Wernberg, T., Joy, B.A., de Bettignies, T., Campbell, A.H., 2015. Central and rear-edge populations can be equally vulnerable to warming. Nature Communications 6, 10280. https://doi.org/10.1038/ncomms10280

Borburema, H.D.S., Yokoya, N.S., Souza, J.M.C., Nauer, F., Barbosa-Silva, M.S., Marinho-Soriano, E., 2022. Ocean warming and increased salinity threaten Bostrychia (Rhodophyta) species from genetically divergent populations. Marine Environmental Research 178, 105662. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105662

Carneiro, M.A.A., Marinho-Soriano, E., 2021. Macroalgas marinhas: biologia, ecologia e importância econômica. In: Viana, D.L., Oliveira, J.E.L., Hazin, F.H.V., Souza, M.A.C. de (Eds.), Ciências do mar: dos oceanos do mundo ao nordeste do Brasil: bioecologia, pesca e aquicultura, vol. 2, first ed. Via Design Publicações, Olinda, PE, pp. 90–119.

Cavanaugh, K.C., Reed, D.C., Bell, T.W., Castorani, M.C.N., Beas-Luna, R., 2019. Spatial variability in the resistance and resilience of giant kelp in Southern

and Baja California to a multiyear heatwave. Frontiers in Marine Science 6, 413. https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00413

Celis-Plá, P.S.M., Trabal, A., Navarrete, C., Troncoso, M., Moenne, F., Zúñiga, A., Figueroa, F.L., Sáez, C.A., 2022. Daily changes on seasonal ecophysiological responses of the intertidal brown macroalga Lessonia spicata: implications of climate change. Frontiers in Plant Science 13, 941061. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.941061

Chiaramonte, A.R., Faria, A.V.F., Plastino, E.M., 2023. Thermal tolerance of the red alga Gracilaria caudata reveals ecotypes for the Brazilian coast. Journal of Applied Phycology 36, 537–544. https://doi.org/10.1007/s10811-023-03048-2

Fabbrizzi, E., Munari, M., Fraschetti, S., Arena, C., Chiarore, A., Cannavacciuolo, A., Colletti, A., Costanzo, G., Soler-Fajardo, A., Nannini, M., Savinelli, B., Silvestrini, C., Vitale, E., Tamburello, L., 2023. Canopy-forming macroalgae can adapt to marine heatwaves. Environmental Research 238, 117218. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117218

Filbee-Dexter, K., Wernberg, T., Grace, S.P., Thormar, J., Fredriksen, S., Narvaez, C.N., Feehan, C.J., Norderhaug, K.M., 2020. Marine heatwaves and the collapse of marginal North Atlantic kelp forests. Scientific Reports 10, 13388. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70273-x

Gouvêa, L.P., Schubert, N., Martins, C.D.L., Sissini, M., Ramlov, F., Rodrigues, E.R.O., Bastos, E.O., Freire, V.C., Maraschin, M., Simonassi, J.C., Varela, D.A., Franco, D., Cassano, V., Fonseca, A.L., Barufi, J.B., Horta, P.A., 2017. Interactive effects of marine heatwaves and eutrophication on the ecophysiology of a widespread and ecologically important macroalga. Limnology and Oceanography 62, 2056–2075. https://doi.org/10.1002/lno.10551

Hobday, A.J., Alexander, L.V., Perkins, S.E., Smale, D.A., Straub, S.C., Oliver, E.C.J., Benthuysen, J.A., Burrows, M.T., Donat, M.G., Feng, M., Holbrook, N.J., Moore, P.J., Scannell, H.A., Sen Gupta, A., Wernberg, T., 2016. A hierarchical approach to defining marine heatwaves. Progress in Oceanography 141, 227–238. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.12.014

Jiang, M., Gao, L., Huang, R., Lin, X., Gao, G., 2022. Differential responses of bloom-forming Ulva intestinalis and economically important Gracilariopsis lemaneiformis to marine heatwaves under changing nitrate conditions. Science of the Total Environment 840, 156591. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156591

Krause-Jensen, D., Duarte, C.M., 2016. Substantial role of macroalgae in marine carbon sequestration. Nature Geoscience 9, 737–742. https://doi.org/10.1038/ngeo2790

Musrri, C.A., Wood, G., Vergés, A., Britton, D., Hurd, C.L., Marzinelli, E.M., 2026. Response of early life-stages of forest-forming seaweeds from warm-

edge and central populations to marine heatwaves. Ecology and Evolution 16, e72998. https://doi.org/10.1002/ece3.72998

Nações Unidas Brasil, 2026. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Brasília, DF: ONU Brasil. https://brasil.un.org/pt-br/sdgs.

Nauer, F., Oliveira, M.C., Plastino, E.M., Yokoya, N.S., Fujii, M.T., 2022. Coping with heatwaves: how a key species of seaweed responds to heat stress along its latitudinal gradient. Marine Environmental Research 177, 105620. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105620

Oliver, E.C.J., Donat, M.G., Burrows, M.T., Moore, P.J., Smale, D.A., Alexander, L.V., Benthuysen, J.A., Feng, M., Sen Gupta, A., Hobday, A.J., Holbrook, N.J., Perkins-Kirkpatrick, S.E., Scannell, H.A., Straub, S.C., Wernberg, T., 2018. Longer and more frequent marine heatwaves over the past century. Nature Communications 9, 1324. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03732-9

Rendina, F., Bouchet, P.J., Apolloni, L., Russo, G., Sandulli, R., Putra, A.D.P., Kolzenburg, R., Ragazzola, F., 2019. Physiological response of the coralline alga Corallina officinalis L. to both predicted long-term increases in temperature and short-term heatwave events. Marine Environmental Research 150, 104764. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104764

Saha, M., Barboza, F.R., Somerfield, P.J., Al-Janabi, B., Beck, M., Brakel, J., Ito, M., Pansch, C., Nascimento-Schulze, J.C., Jakobsson-Thor, S., Weinberger, F., Sawall, Y., 2020. Response of foundation macrophytes to near-natural simulated marine heatwaves. Global Change Biology 26, 417–430. https://doi.org/10.1111/gcb.14801

Seo, H.-M., Im, H.-J., Lee, W.-J., Park, E.-J., 2026. Temperature stress and recovery responses in juvenile blades of Neopyropia yezoensis (Bangiales, Rhodophyta). Aquaculture 620, 743926. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2026.743926

Smale, D.A., Wernberg, T., Oliver, E.C.J., Thomsen, M., Harvey, B.P., Straub, S.C., Burrows, M.T., Alexander, L.V., Benthuysen, J.A., Donat, M.G., Feng, M., Hobday, A.J., Holbrook, N.J., Perkins-Kirkpatrick, S.E., Scannell, H.A., Sen Gupta, A., Payne, B.L., Moore, P.J., 2019. Marine heatwaves threaten global biodiversity and the provision of ecosystem services. Nature Climate Change 9, 306–312. https://doi.org/10.1038/s41558-019-0412-1

Steneck, R.S., Graham, M.H., Bourque, B.J., Corbett, D., Erlandson, J.M., Estes, J.A., Tegner, M.J., 2002. Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. Environmental Conservation 29, 436–459. https://doi.org/10.1017/S0376892902000322

Thomsen, M.S., Mondardini, L., Alestra, T., Gerrity, S., Tait, L., South, P.M., Lilley, S.A., Schiel, D.R., 2019. Local extinction of bull kelp (Durvillaea spp.) due

to a marine heatwave. Frontiers in Marine Science 6, 84. https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00084

Wernberg, T., Bennett, S., Babcock, R.C., de Bettignies, T., Cure, K., Depczynski, M., Dufois, F., Fromont, J., Fulton, C.J., Hovey, R.K., Harvey, E.S., Holmes, T.H., Kendrick, G.A., Radford, B., Santana-Garcon, J., Saunders, B.J., Smale, D.A., Thomsen, M.S., Tuckett, C.A., Tuya, F., Vanderklift, M.A., Wilson, S., 2016. Climate-driven regime shift of a temperate marine ecosystem. Science 353, 169–172. doi:10.1126/science.aad8745

Wynn, O.J., Britton, D., Beardall, J., Iha, C., Nardelli, A., Raven, J.A., Bridle, A., Hurd, C.L., 2025. Short-term resilience, long-term costs: reduced growth and increased erosion in the kelp Ecklonia radiata (phylum Ochrophyta) following repeated marine heatwaves. Journal of Phycology 61, 1355–1370. https://doi.org/10.1111/jpy.70076

Zuo, X., Xu, L., Luo, L., Zeng, Y., Ma, Z., Wu, M., Chen, B., 2023. Physiological responses of Sargassum fusiforme seedlings to high-temperature stress. Regional Studies in Marine Science 62, 102900. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.102900

Anexos



Tabela 1. Distribuição percentual dos estudos analisados de acordo com a abordagem metodológica (n = 54).



Figura 1. Nuvem de palavras dos termos mais frequentes nos estudos sobre ondas de calor marinhas (MHWs) e macroalgas. O tamanho das palavras é proporcional à frequência de ocorrência na literatura analisada.



Figura 2. Distribuição percentual dos grupos taxonômicos de macroalgas identificados nos estudos analisados sobre os impactos das ondas de calor marinhas.



Figura 3. Distribuição geográfica dos estudos sobre os impactos das ondas de calor marinhas em macroalgas publicados entre 2015 e 2026. A intensidade das cores representa a proporção de trabalhos identificados em cada continente.



Tabela 2. Síntese dos principais estudos que investigaram os efeitos das ondas de calor marinhas (MHWs) sobre macroalgas, destacando as espécies estudadas, regiões de ocorrência, tipo de estudo e variáveis analisadas.

CÓDIGO: SB0209

AUTOR: LUCAS VINICIUS SOUZA DE CARVALHO

ORIENTADOR: AURIGENA ANTUNES DE ARAUJO

TÍTULO: Analise metagenomica das fezes em animais diabeticos tratados com um pacth de quitosana para liberação prolongada da metformina

Resumo

Síndrome metabólica (SM) é uma condição multifatorial caracterizada pela coexistência de obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial e alterações no metabolismo da glicose. Neste estudo, investigou-se a capacidade da dieta de cafeteria (DC) em induzir alterações metabólicas precoces em ratos Wistar, para estabelecer o modelo experimental. A DC foi formulada com ração padrão, leite condensado, açúcar, gordura hidrogenada, óleo de soja e biscoito recheado, seguida de processamento térmico. Os animais (n = 32) foram alocados em 4 grupos experimentais: Saudável, estreptozotocina (STZ), DC e DC+STZ. Após 102 dias de indução, foram avaliados parâmetros antropométricos, insulina sérica, índices HOMA, citocinas inflamatórias (IL-1beta e IL-6), expressão gênica de Slc2a4/GLUT4 muscular e de leptina no tecido adiposo, além da composição da microbiota intestinal. A dieta induziu aumento do peso (+172,3%) e da circunferência abdominal (+38,7%; $p < 0,01$), hiperglicemia (Md: 403 mg/dL), hipertrigliceridemia (Md: 131 mg/dL), aumento da insulina sérica e de HOMA-IR (Md: 206,58; Q25–Q75: 151,81–300,65). Observou-se redução da expressão de Slc2a4/GLUT4 ($p < 0,01$) e aumento de leptina ($p < 0,05$). Evidenciou-se predominância de Firmicutes e Ligilactobacillus. Os resultados mostram que a DC induziu alterações compatíveis com a SM e resistência à insulina associada à obesidade, ativação inflamatória, comprometimento metabólico, alterações na expressão de genes e microbiota intestinal.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Dieta de Cafeteria. Modelo experimental

TITLE: Metagenomic analysis of feces in diabetic animals treated with a chitosan patch for sustained release of metformin

Abstract

Metabolic syndrome (MS) is a multifactorial condition characterized by the coexistence of obesity, dyslipidemia, arterial hypertension, and impaired glucose metabolism. In this study, we investigated the capacity of a cafeteria diet (CAF) to induce early metabolic alterations in Wistar rats in order to establish an experimental model. The CAF was formulated using standard chow, condensed milk, sugar, hydrogenated fat, soybean oil,

and sandwich cookies, followed by thermal processing. The animals (n = 32) were allocated into 4 experimental groups: Healthy, Streptozotocin (STZ), CAF, and CAF+STZ. After 102 days of induction, anthropometric parameters, serum insulin, HOMA indices, inflammatory cytokines (IL-1beta and IL-6), muscle Slc2a4/GLUT4 and adipose tissue leptin gene expression, as well as gut microbiota composition, were evaluated. The diet induced an increase in body weight (+172.3%) and abdominal circumference (+38.7%; $p < 0.01$), hyperglycemia (Md: 403 mg/dL), hypertriglyceridemia (Md: 131 mg/dL), and an increase in serum insulin and HOMA-IR (Md: 206.58; Q25–Q75: 151.81–300.65). A decrease in Slc2a4/GLUT4 expression ($p < 0.01$) and an increase in leptin ($p < 0.05$) were observed. A predominance of Firmicutes and Ligilactobacillus was evidenced. The results show that the CAF induced alterations consistent with MetS and obesity-associated insulin resistance, inflammatory activation, metabolic impairment, alterations in gene expression, and changes in the gut microbiota.

Keywords: Metabolic syndrome. Cafeteria diet. Experimental model.

Introdução

A síndrome metabólica (SM) é uma desordem multifatorial caracterizada pela coexistência de obesidade, dislipidemia, hipertensão e comprometimento do metabolismo da glicose, condições que, coletivamente, aumentam o risco de doenças cardiovasculares e Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2). A SM está associada à resistência à insulina e à inflamação crônica de baixo grau, representando um importante problema de saúde pública em razão do aumento de sua prevalência e de sua associação com o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. (Swarup et al., 2024). O desenvolvimento da SM tem sido associada a fatores relacionados ao estilo de vida moderno, particularmente a padrões alimentares caracterizados pelo alto consumo de gorduras saturadas, carboidratos refinados e alimentos ultraprocessados. Esses hábitos alimentares promovem ingestão calórica excessiva, expansão do tecido adiposo, inflamação sistêmica e comprometimento progressivo das vias de sinalização da insulina (Islam et al., 2024).

Modelos animais baseados em manipulação dietética são amplamente empregados para reproduzir aspectos dos distúrbios metabólicos humanos. Assim, a dieta de cafeteria (DC), elaborada neste estudo, destaca-se por simular características do padrão alimentar marcado pelo consumo de alimentos ultraprocessados ricos em açúcares, gorduras e sódio, promovendo hiperfagia, aumento do peso corporal e elevada ingestão calórica. Consequentemente, a DC é capaz de induzir modelos animais alterações associadas à SM, tais como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e inflamação sistêmica (Sampey et al., 2011). A exposição prolongada DC em ratos Wistar constitui uma ferramenta metodológica experimental relevante para o estudo da SM e da resistência à insulina. Esse modelo pode induzir alterações associadas à fase inicial do desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 2, tais como ganho de massa corporal, expansão da adiposidade visceral, dislipidemia e alterações na homeostase glicêmica.

No entanto, as abordagens convencionais baseadas na oferta de diferentes itens alimentares apresentam limitações que comprometem a robustez dos achados, já que a preferência alimentar seletiva entre os animais pode resultar variações na ingestão de

nutrientes, aumentando a variabilidade individual e dificultando a reprodutibilidade dos e a interpretação dos mecanismo envolvidos. Além disso, o processamento térmico dos alimentos pode promover alterações físico-químicas. A cocção de matrizes ricas em carboidratos e lipídios pode induzir a formação de produtos da reação de Maillard e compostos de glicação avançada, podendo contribuir para o estresse oxidativo, resposta inflamatória, alterações na sinalização de insulina e modificações da microbiota intestinal. Assim, o impacto dessas dietas decorre não apenas do seu perfil nutricional, mas também das modificações físico-químicas oriundas do processamento térmico. (Sampey et al., 2011; Skovso, 2014)

Para contornar essas limitações, foi desenvolvida uma DC padronizada, homogeneizada e processada a 180 °C com composição fixa, visando reproduzir o perfil nutricional e de processamento associadas a alimentos ultraprocessados. A padronização da formulação da DC reduz a seleção alimentar e favorece a exposição dietética uniforme entre os grupos experimentais. Além disso, o processamento térmico considera as transformações físico-químicas decorrentes da cocção, corroborando para padronização e reprodutibilidade.

Portanto, este estudo teve como objetivo estabelecer e caracterizar um modelo experimental reprodutível de SM em estágio inicial em ratos Wistar, por meio de uma DC termicamente processada, investigando suas repercussões metabólicas, inflamatórias, teciduais, moleculares e na composição da microbiota intestinal. A hipótese deste estudo, fundamentou-se na premissa de que a exposição prolongada à DC seria capaz de induzir alterações metabólicas e na composição da microbiota intestinal, compatíveis com o estágio inicial da SM.

Metodologia

Delineamento Experimental e Animais

Foram utilizados 32 ratos Wistar machos, com 6 semanas de vida e massa corporal inicial de 180 a 220 g, provenientes do Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As instalações e os procedimentos atenderam às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI), com aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais Institucionais (CEUA/UFRN; protocolo nº 044/2025). Os animais foram alojados sob condições ambientais padronizadas (temperatura de 22 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

Controle Negativo (Saudável, n = 6): dieta padrão comercial durante todo o período, sem indução farmacológica;

STZ (STZ, n = 5): dieta padrão e administração intraperitoneal (i.p.) de STZ (35 mg/kg);

DC + STZ (Cafeteria+STZ, n = 14): dieta de cafeteria por 42 dias, seguida de STZ (35 mg/kg, i.p.) e manutenção da mesma dieta;

DC (Cafeteria, n = 7): dieta de cafeteria exclusiva durante todo o protocolo, sem STZ.

Formulação e Processamento Térmico da Dieta de Cafeteria

A DC padronizada foi formulada para apresentar alta densidade energética (427,3 kcal/100 g), contendo 59,1 g de carboidratos, 18,5 g de lipídios, 8,9 g de proteínas e 2,1 g de fibras por 100 g. A composição proporcional (por quilograma de massa final) incluiu: 300 g de biscoito recheado sabor chocolate triturado, 250 g de ração comercial moída, 250 g de leite condensado, 100 g de açúcar cristal, 90 g de margarina e 10 g de óleo de soja.

Inicialmente, os ingredientes sólidos foram triturados e homogeneizados. Paralelamente, os componentes lipídicos e o leite condensado foram misturados até a obtenção de emulsão semissólida, que foi incorporada à fração seca até homogeneização completa. A massa foi disposta em camada uniforme de aproximadamente 1 cm em assadeira untada e submetida a processamento térmico em forno pré-aquecido a 180 °C durante 30 minutos (10 minutos iniciais, seguidos de 20 minutos adicionais), favorecendo a formação de produtos da reação de Maillard. Após a cocção, a matriz foi fracionada ainda morna em cubos padronizados de 3 × 3 × 1 cm e resfriada sob condições controladas antes do fornecimento diário.

Protocolo Experimental e Eutanásia

O protocolo teve duração total de 102 dias (14 semanas). No 42º dia, STZ recém-preparada em tampão citrato (0,1 M, pH 4,5) foi administrada aos grupos pertinentes. No 102º dia, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica com cetamina (240 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg, i.p.). Após a confirmação da perda dos reflexos nociceptivos, realizou-se a punção cardíaca para coleta de sangue em tubos com e sem EDTA. Amostras teciduais (fígado, rins, pâncreas, tecido adiposo visceral e músculo esquelético) e fezes foram colhidas para análises posteriores.

Avaliação Antropométrica e Classificação Fenotípica

O peso corporal e a circunferência abdominal foram aferidos no dia 1 e no dia 102 para cálculo do ganho percentual. A adiposidade foi estimada pelo Índice de Lee. Os parâmetros foram classificados em: Normal (<100% de ganho de peso; <20% de ganho abdominal; Lee <300), Sobrepeso (100–150%; 20–35%; Lee 300–310) e Obeso (>150%; >35%; Lee >310).

Análises Bioquímicas, Hematológicas e Imunoensaios

O eritrograma e o leucograma completo foram processados em analisador hematológico automatizado. No soro obtido por centrifugação (3.000 rpm, 15 min), determinaram-se por espectrofotometria (Bioclin): glicose, frutosamina, triglicerídeos, colesterol total, HDL-C, ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, AST, ALT, fosfatase alcalina (ALP), LDH e CK-MB. A fração HbA1c foi dosada por quimioluminescência. Concentrações séricas de insulina, IL-1beta e IL-6 foram quantificadas por ensaios de

ELISA competitivos e do tipo sanduíche (Cloud-Clone e R&D Systems). Os índices de resistência insulínica (HOMA-IR) e função secretora das células beta (HOMA-Beta) foram calculados.

Expressão Gênica Tecidual (RT-qPCR)

O RNA total de músculo esquelético e tecido adiposo visceral foi extraído, dosado e submetido à transcrição reversa para cDNA. Reações de RT-qPCR com química SYBR Green amplificaram os transcritos de Slc2a4 (GLUT4) e Lep (leptina), normalizados por controles constitutivos e calculados pelo método comparativo 2ˆ(–delta delta CT). .

Sequenciamento da Microbiota Intestinal (Nanopore)

O gDNA fecal foi extraído com o kit QIAamp PowerFecal Pro DNA (Qiagen), incluindo lise mecânica por bead-beating (10 min), purificação em coluna de sílica e eluição. O DNA foi quantificado em NanoDrop One e fluorímetro Qubit 3.0 (kit dsDNA BR) e sua integridade checada em gel de agarose 0,8% (110 V, 1 h). A biblioteca genômica foi preparada por PCR com barcoding utilizando LongAmp Hot Start Taq 2× Master Mix, purificada com esferas AMPure XP e ligada a Rapid Adapters. A leitura foi executada na plataforma MinION MK1B (Oxford Nanopore Technologies), processando os códigos brutos via Epi2me Labs.

Análise Histopatológica

Fragmentos de fígado, rim, pâncreas e tecido adiposo visceral foram fixados em formalina tamponada a 10% (24–48 h), incluídos em parafina, seccionados a 4–5 uM e corados por Hematoxilina e Eosina (H&E). Avaliações semiquantitativas em microscopia óptica (escores de 0 a 4) mensuraram glomeruloesclerose, fibrose intersticial e alterações tubulares nos rins; esteatose, inflamação lobular e balonização no fígado; integridade e insulite no pâncreas; e hipertrofia e infiltrado no tecido adiposo visceral.

Resultados e Discussões

Parâmetros Antropométricos e Indução do Fenótipo Obesogênico

A avaliação ponderal e biométrica dos animais ao término do protocolo experimental de 102 dias demonstrou marcadas distinções no perfil de crescimento em função da intervenção dietética imposta. Os animais mantidos sob dieta padrão apresentaram um desenvolvimento fisiológico regular, com aumento percentual médio de massa corporal de +81,7% no grupo Controle Saudável e de +78,3% no grupo STZ, acompanhados por incrementos discretos na circunferência abdominal de +13,1% e +17,3%, respectivamente, alinhando-se aos padrões de crescimento esperados para a linhagem Wistar adulta (Tabela 5). Em nítido contraste, a intervenção nutricional hipercalórica desencadeou sobrecarga expansiva evidente: o grupo submetido à combinação de DC e STZ (DC+STZ) atingiu um ganho de peso de +131,4% e expansão abdominal de

+31,8%, caracterizando um fenótipo de sobrepeso. O impacto mais contundente manifestou-se no grupo alimentado exclusivamente com a formulação de cafeteria, no qual se constatou um incremento de +172,3% na massa corporal e de +38,7% na circunferência abdominal, consolidando o fenótipo de obesidade evidente (Tabela 5).

Esse ganho ponderal acelerado e o acúmulo adiposo troncular reforçam o elevado potencial obesogênico de matrizes alimentares enriquecidas com açúcares simples, lipídios saturados e produtos ultraprocessados, as quais mimetizam fidedignamente o padrão dietético ocidental associado ao surgimento da síndrome metabólica na espécie humana (Swinburn et al., 2011). Dietas do tipo cafeteria promovem hiperfagia e rápido ganho de peso em roedores devido à densidade energética substancial e à alta palatabilidade, sobrepujando os mecanismos homeostáticos usuais de saciedade. A consistência na magnitude desses desfechos morfológicos observada entre os indivíduos alimentados com a DC atesta a eficácia da matriz padronizada e termicamente processada empregada neste ensaio, superando a expressiva variabilidade interindividual descrita em protocolos convencionais de livre escolha (Sampey et al., 2011; Heyne et al., 2009).

A adiposidade foi adicionalmente confirmada pela determinação do Índice de Lee no 102º dia de protocolo. Em virtude do ganho somático ontogenético, todos os grupos experimentais apresentaram aumento deste índice ao longo do tempo; todavia, os animais pertencentes ao grupo DC alcançaram um índice médio de 304,6, enquadrando-se na faixa correspondente a sobrepeso/adiposidade aumentada, ao passo que os grupos controle e STZ mantiveram-se dentro da faixa de higidez (<300) (Tabela 5). A expansão exacerbada do tecido adiposo atua como gatilho primordial de estresse metabólico, estimulando hipertrofia de adipócitos, sobrecarga lipolítica e influxo ectópico de ácidos graxos em parênquimas nobres (Xu et al., 2003). O processamento térmico a 180 °C empregado na manufatura dos pellets favorece a reação de Maillard, gerando compostos voláteis e sensoriais atrativos que estimulam a hiperfagia hedônica e atenuam o controle do balanço energético central (Myers et al., 2008).

Homeostase Glicêmica, Dinâmica da Insulina e Resistência Periférica

A avaliação do metabolismo glicídico revelou pronunciada hiperglicemia de jejum nos animais sob intervenção nutricional hipercalórica. O grupo controle saudável exibiu glicemia mediana de 250,5 mg/dL, ao passo que os grupos STZ (mediana: 351 mg/dL), DC +STZ (mediana: 388 mg/dL; intervalo de 326 a 472 mg/dL) e DC isolada (mediana: 403 mg/dL; intervalo de 370 a 529 mg/dL) exibiram elevações acentuadas, atingindo níveis francamente compatíveis com perturbação glicêmica experimental (>300 mg/dL) (Tabela 6). Cumpre salientar que a eutanásia foi executada sob protocolo anestésico à base de cetamina e xilazina. Visto que a xilazina atua como agonista de receptores alfa2-adrenérgicos pancreáticos inibindo agudamente a secreção basal de insulina, os níveis absolutos de glicemia sérica sofreram um incremento farmacológico sistemático e comum a todos os grupos, preservando a validade analítica das variações intergrupais relativas (Saha et al., 2005).

A elucidação fisiopatológica desse estado hiperglicêmico torna-se patente quando integrada aos níveis de insulina circulante e aos índices HOMA. Ao normalizar os valores em função do grupo controle (HOMA-IR de referência = 105,9), o grupo DC demonstrou expressivo aumento do índice, atingindo mediana de 206,58 (Q25–Q75:

151,81–300,65), categorizando um quadro de resistência insulínica moderada a severa acompanhada por hiperinsulinemia compensatória. Comportamento similar foi evidenciado no grupo DC+STZ, com mediana de HOMA-IR de 218,47 (Q25–Q75: 140,64–232,99) (Tabela 6, Tabela 4). O grupo STZ isolado apresentou mediana de 172,96 com ampla dispersão (Q25–Q75: 139,37–214,73), refletindo a clássica variabilidade lesiva associada à administração de agentes citotóxicos pancreáticos (Skovso, 2014). A concomitância de hiperglicemia e HOMA-IR acentuado no grupo DC corrobora que a formulação dietética induz precocemente resistência periférica à insulina antes da exaustão completa das células beta, reproduzindo o curso natural da síndrome metabólica sem necessidade de agressão química artificial (Sampey et al., 2011).

No tocante ao controle glicêmico de longo prazo, a quantificação de hemoglobina glicada (HbA1c) demonstrou que a maioria dos animais sob DC manteve valores basais dentro da amplitude fisiológica (3,9% a 4,6%), similar ao grupo saudável . Contudo, frações individuais atingiram índices de 8,7% a 9,5% no grupo DC e 8,1% no grupo DC+STZ. Essa dispersão atesta a suscetibilidade metabólica heterogênea inerente aos modelos animais, reforçando que, em 102 dias de protocolo, a intervenção reproduz primordialmente a fase incipiente da síndrome metabólica marcada por resistência insulínica tecidual e elevações glicêmicas flutuantes, precedendo o estabelecimento de hiperglicemia crônica sustentada e glicação proteica generalizada em todos os indivíduos(Tabela 1) (Panchal; Brown, 2011; Petersen; Shulman, 2018).

Perfil Lipídico, Função Renal, Biomarcadores Hepáticos e Musculares

A sobrecarga de nutrientes ultraprocessados induziu disfunção evidente no metabolismo de lipídios. Os teores de triglicerídeos séricos mostraram-se significativamente elevados nos grupos expostos à DC: o grupo DC apresentou mediana de 131 mg/dL (amplitude interquartil: 111–154 mg/dL) e o grupo DC+STZ atingiu 145 mg/dL (112–193 mg/dL), superando com folga a faixa observada nos animais controles (64 mg/dL; 55–70,5 mg/dL) (Tabela 6, colunas TG). O grupo STZ isolado exibiu níveis intermediários e instáveis (mediana de 96 mg/dL; 58–148 mg/dL) (Tabela 6). Esses dados comprovam que a hipertrigliceridemia é consequência direta do aporte crônico de lipídios saturados e carboidratos refinados (frutose e sacarose presentes no leite condensado e biscoitos recheados), os quais estimulam a lipogênese hepática e a hipersecreção de VLDL, fenômeno potencializado pela agressão de STZ (Islam et al., 2024).

A análise da função renal apontou maior preservação estrutural no grupo DC isolada e sobrecarga funcional no grupo STZ (Tabela 6, colunas UREA, CREATININE, UA). Os níveis de ureia sérica elevaram-se predominantemente nos animais que receberam STZ (mediana de 58 mg/dL versus 38 mg/dL no controle), acompanhados por elevação do ácido úrico (3 mg/dL no STZ e 2 mg/dL no DC+STZ versus 1 mg/dL no controle e DC). A hiperuricemia no grupo sob intervenção mista decorre do catabolismo aumentado de purinas e da sobrecarga nefrotóxica induzida pela STZ. Por sua vez, a creatinina sérica manteve-se estável (1 mg/dL em todos os grupos) e as proteínas totais situam-se em faixas fisiológicas (6 g/dL), afastando a ocorrência de insuficiência renal avançada, proteinúria massiva ou falência na capacidade de síntese biológica do fígado (Tabela 6).

Os marcadores de lesão hepatocelular primária, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), mantiveram-se dentro dos intervalos de referência fisiológicos na quase totalidade das amostras (AST de 78 U/L no DC e 95 U/L no controle; ALT de 52 U/L no DC e 60 U/L no controle), com a razão AST/ALT permanecendo estável (valores entre 1 e 3) (Tabela 6, colunas AST, ALT, AST/ALT ratio). Isso evidencia a ausência de necrose celular aguda ou citólise parenquimatosa massiva. Entretanto, a fosfatase alcalina (ALP) registrou incremento expressivo nos animais sob DC (mediana de 250 U/L no DC e 181 U/L no DC+STZ versus 170 U/L no controle) (Tabela 6). Essa alteração sugere colestase intracanalicular incipiente, sobrecarga metabólica e esteatose precoce em nível molecular (Lalanza; Snoeren, 2021).

A fração muscular/cardíaca creatina quinase MB (CK-MB) elevou-se expressivamente nos grupos tratados (mediana de 342 U/L no DC e 402 U/L no DC+STZ em comparação a 230 U/L no controle) (Tabela 6). Esse comportamento aponta para estresse metabólico muscular sistêmico e potencial cardiomiopatia metabólica incipiente em decorrência da lipotoxicidade, inflamação crônica e desequilíbrio oxidativo impostos pelo modelo.

O hemograma completo não demonstrou alterações em séries vermelha ou contagem global de plaquetas (Tabela 7). Contudo, identificou-se maior amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) nos grupos DC e DC+STZ, sugerindo anisocitose e estresse eritrocitário associados à toxicidade glicolipídica crônica (Tabela 7). O perfil leucocitário manteve a típica predominância de linfócitos (76% no controle e DC; 81,5% no DC+STZ), com dispersão ampliada no grupo combinado indicativa de resposta imunometabólica crônica não infecciosa (Tabela 7).

Inflamação Sistêmica e Modulação da Expressão Gênica (Slc2a4 e Leptina)

A dosagem imunoenzimática (ELISA) de mediadores inflamatórios séricos demonstrou a consolidação de um ambiente pró-inflamatório crônico de baixo grau. Observou-se elevação estatisticamente significativa nos níveis de IL-1beta e IL-6 nos grupos submetidos à intervenção quando comparados ao controle saudável ($p < 0,05$) (Figura 2). Em particular, as concentrações séricas de IL-1beta elevaram-se de forma expressiva nos grupos DC e DC+STZ, ultrapassando os patamares de 400 pg/mL, enquanto a IL-6 manteve trajetória ascendente sustentada (Figura 2).

A ativação dessas cascatas pró-inflamatórias atua como elemento mecanístico determinante na gênese da síndrome metabólica (15, 16). A cocção da matriz a 180 °C favorece a reação entre carboidratos redutores (lactose e sacarose) e proteínas da dieta, impulsionando a síntese de produtos de glicação avançada (AGEs). Estes compostos ligam-se a receptores de superfície teciduais (RAGE) e desencadeiam cascatas dependentes de NF-kappaBeta, culminando na transcrição e secreção de citocinas inflamatórias que atenuam a sensibilidade à insulina (Gregor; Hotamisligil, 2011).

Os ensaios de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) comprovaram que essa sobrecarga inflamatória e nutricional culmina em desregulação transcricional tecidual (Figura 2). No tecido muscular esquelético, observou-se uma modulação negativa (downregulation) altamente significativa na expressão do mRNA do gene Slc2a4, codificador do principal transportador de glicose

insulino-dependente, GLUT4, no grupo DC ($p < 0,01$) e no grupo DC+STZ ($p < 0,05$) em relação aos animais saudáveis (Figura 2). A atenuação do transcrito Slc2a4 decorre da repressão imposta pelas vias inflamatórias e pelo acúmulo intracelular de derivados lipídicos, constituindo a base molecular da captação periférica deficiente de glicose e da consequente hiperglicemia e resistência insulínica (DeFronzo; Tripathy, 2009).

Simultaneamente, a expressão do mRNA do gene da Leptina no tecido adiposo visceral foi significativamente superexpressa (upregulation) nos grupos DC e DC+STZ ($p < 0,05$), atingindo os maiores níveis relativos no grupo alimentado exclusivamente com a DC (Figura 2). Sabendo-se que a leptina é um peptídeo secretado em proporção direta à expansão da massa adiposa, a hiperleptinemia transcricional reflete a hipertrofia tecidual somada ao desenvolvimento de resistência à leptina no eixo hipotalâmico, neutralizando sua capacidade de suprimir o apetite e perpetuando o consumo alimentar hiperfágico desregulado (Myers et al., 2008).

Estruturação da Microbiota Intestinal e Simplificação Ecológica

O perfil metagenômico bacteriano revelou profundas alterações na arquitetura microbiana intestinal induzidas pela DC processada (Tabela 8). Os índices de diversidade alfa (Shannon e Simpson) demonstraram manutenção aparente no grupo DC (Shannon: 2,12 ± 0,72; Simpson: 0,638 ± 0,197) em comparação com o grupo controle (Shannon: 1,73 ± 0,19; Simpson: 0,633 ± 0,064), diferindo da elevação induzida no grupo STZ isolado (Shannon: 2,89 ± 0,37) (Tabela 8A). Essa estabilidade aparente não reflete um ecossistema saudável e resiliente, mas decorre de uma extrema simplificação taxonômica pautada em dominância seletiva (Turnbaugh et al., 2006).

Em nível taxonômico de filo, o grupo DC demonstrou a predominância esmagadora do filo Firmicutes (99,83%), suprimindo quase totalmente os demais filos, incluindo Pseudomonadota (0,14%) e Bacteroidota (0,03%) (Tabela 8B). A expansão maciça de Firmicutes e o colapso na relação Firmicutes/Bacteroidota constituem marcas consolidadas na microbiota de hospedeiros obesos, associando-se diretamente à elevação na capacidade enzimática de extrair calorias dos substratos luminais e transportar lipídios (Turnbaugh et al., 2006).

No nível de gênero e família, a análise detalhada confirmou o colapso da diversidade funcional: o gênero Ligilactobacillus representou 99,36 ± 0,61% da composição total no grupo DC (versus 90,41 ± 9,51% no controle), acompanhado pela família Lactobacillaceae dominando 99,52 ± 0,44% das leituras (Tabela 8C e 8D). Embora microrganismos fermentadores sejam habitualmente comensais, a monodominância absoluta de um único grupo traduz um empobrecimento ecológico crítico, reduzindo a variabilidade de metabólitos funcionais e a produção balanceada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) essenciais à imunidade e à integridade epitelial (Flint et al., 2012). A matriz dietética assada a 180 °C e saturada de carboidratos simples selecionou preferencialmente bactérias sacarolíticas e termorresistentes de crescimento rápido.

Diferentemente do modelo combinado DC+STZ que apresentou colonização evidente por microrganismos potencialmente patogênicos e oportunistas da família Enterobacteriaceae (13,73 ± 14,96%), tais como Klebsiella (5,21%) e Escherichia-Shigella (4,66%), o grupo sob dieta de DC isolada não apresentou proliferação desses táxons (Tabela 8C e 8D). Esse contraste revela que a dieta termicamente processada

atua de forma precoce induzindo um perfil pré-disbiótico metabólico, caracterizado por hipersensibilidade de aproveitamento calórico e perda de redundância funcional, sem provocar endotoxemia inflamatória massiva; esta última parece exigir a sobrecarga citotóxica adicional imposta pela STZ para emergir plenamente (Tilg; Kaser, 2011).

Achados Histopatológicos em Órgãos-Alvo e Remodelamento Tecidual Precoce

A análise morfológica e histopatológica de tecidos-alvo elucidou o caráter incipiente e tecidual-específico das alterações decorrentes do modelo experimental (Figura 3). No parênquima hepático, a avaliação semiquantitativa revelou ausência de esteatose macrovesicular consolidada em ambos os grupos avaliados (Figura 3). Observaram-se apenas discretos focos de balonização hepatocelular e inflamação lobular residual, resultando em escores histológicos totais sem diferença estatística entre o grupo DC e o controle saudável (teste de Mann-Whitney, $p = 0,49$). A ausência de esteato-hepatite macroscópica ou necrose celular franca, a despeito da hiperglicemia e hipertrigliceridemia sistêmicas, indica que o protocolo de 102 dias capta os momentos inaugurais da disfunção metabólica, caracterizados por alterações funcionais e moleculares (como a repressão de GLUT4 e elevação de ALP) que antecedem o dano tecidual irreversível e o colapso arquitetural hepático.

O parênquima renal manteve sua integridade arquitetural amplamente preservada em ambos os grupos. Glomeruloesclerose, hialinose arteriolar de vasos aferentes/eferentes e fibrose tubulointersticial estiveram ausentes (escore 0) em todos os espécimes (Figura 3). Constataram-se apenas discretos focos de infiltrado inflamatório intersticial e alterações tubulares focais em alguns animais alimentados com a DC, gerando um escore total mediano de 0 (intervalo de 0 a 2) versus 0 (0 a 0) nos animais saudáveis, sem alcançar significância estatística ($p > 0,05$). Esses dados ratificam os achados laboratoriais de creatinina sérica inalterada e ausência de insuficiência renal crônica em fase inicial (Tabela 6).

No parênquima pancreático, o grupo saudável exibiu escore mediano de 0 (IIQ: 0–0), com integridade estrutural plena das ilhotas de Langerhans e ausência de infiltrado inflamatório (Figura 3). Já o grupo DC apresentou maior variabilidade de escores (variando de 1 a 5; mediana = 0; IIQ: 0–1; $p = 0,074$), exibindo um espectro contínuo de alterações: infiltrado leucocitário peri-ilhotas (escore 1), peri-insulite (escore 2), insulite moderada (escore 3), desestruturação arquitetural das ilhotas (escore 4) e focos de atrofia insular com perda celular (escore 5) (Figura 3). Essa suscetibilidade pancreática inicial corrobora a hipótese de que a lipotoxicidade e a inflamação de baixo grau impõem uma agressão progressiva sobre o tecido endócrino, provocando remodelamento e estresse das células beta secretoras antes de sua falência total, correlacionando-se com a resistência insulínica e as alterações de HOMA-IR observadas (Sampey et al., 2011).

Por fim, o exame do tecido adiposo visceral demonstrou hipertrofia adipocitária significativa nos animais submetidos à DC em comparação aos controles saudáveis ($p < 0,01$) (Figura 3). Não foram detectadas estruturas em coroa (crown-like structures - CLS), pontes de fibrose tecidual ou infiltrado massivo de macrófagos em nenhum dos animais avaliados (Figura 3). A presença isolada de hipertrofia celular na ausência de inflamação necrótica franca atesta que o remodelamento da matriz adiposa ocorre nos estágios precoces da sobrecarga lipídica, servindo como o elemento indutor inicial para

a hipersecreção de leptina e o desencadeamento da resistência insulínica periférica (Xu et al., 2003).

Conclusão

Em conclusão a DC padronizada e termicamente processada desenvolvida neste estudo foi capaz de induzir alterações compatíveis com o estágio inicial da SM em ratos Wistar. Além de sua composição hipercalórica, a padronização da composição e do processamento térmico favoreceu a uma exposição dietética mais uniforme e reprodutível entre os grupos experimentais. O consumo prolongado da DC promoveu aumento da adiposidade, alterações inflamatórias, no metabolismo da glicose e no pâncreas, bem como alterações na expressão de genes relacionados ao GLUT4 e à leptina, além de modificações na composição da microbiota intestinal. Estes achados demonstram o estabelecimento de um modelo experimental de SM em ratos Wistar para estudos de alterações metabólicas associadas à SM, com potencial para ser aplicado em estudos de intervenções terapêuticas.

Referências

SWARUP, Supreeya et al. Metabolic syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Disponível em:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459248/. Acesso em: 26 ago. 2026.

ISLAM, Md. Sharifull et al. The interplay of factors in metabolic syndrome: understanding its roots and complexity. Molecular Medicine, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 279, 2024. DOI:https://doi.org/10.1186/s10020-024-01019-y. Acesso em: 26 ago. 2026.

SAMPEY, Brante P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. Obesity, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1109–1117, jun. 2011. DOI:https://doi.org/10.1038/oby.2011.18. Acesso em: 26 ago. 2026.

HEYNE, Andrea et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. Addiction Biology, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 373–383, out. 2009. DOI:https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00175.x. Acesso em: 26 ago. 2026.

SWINBURN, Boyd A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. The Lancet, [s. l.], v. 378, n. 9793, p. 804–814, ago. 2011. DOI:https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60813-1. Acesso em: 26 ago. 2026.

SKOVSO, Søs. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. Journal of Diabetes Investigation, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 349–358, jul. 2014. DOI:https://doi.org/10.1111/jdi.12235. Acesso em: 26 ago. 2026.

XU, Haiyan et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation, [s. l.], v. 112, n. 12, p. 1821–1830, dez. 2003. DOI:https://doi.org/10.1172/JCI19451. Acesso em: 26 ago. 2026.

MYERS, Martin G.; COWLEY, Michael A.; MÜNZBERG, Heike. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. Annual Review of Physiology, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 537–556, mar. 2008. DOI:https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707. Acesso em: 26 ago. 2026.

ROTHOLLIS, Kimberly A. et al. Cafeteria diet feeding alters body composition and fat distribution but not thermogenesis in rats. Experimental Biology and Medicine, [s. l.], v. 230, n. 10, p. 770–778, nov. 2005. DOI:https://doi.org/10.1177/153537020523001012. Acesso em: 26 ago. 2026.

PETERSEN, Max C.; SHULMAN, Gerald I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. Physiological Reviews, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 2133–2223, out. 2018. DOI:https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017. Acesso em: 26 ago. 2026.

PANCHAL, Sunil K.; BROWN, Lindsay. Rodent models for metabolic syndrome research. Journal of Biomedicine and Biotechnology, [s. l.], v. 2011, art. ID 351982, p. 1–14, 2011. DOI:https://doi.org/10.1155/2011/351982. Acesso em: 26 ago. 2026.

LALANZA, Jaume F.; SNOEREN, Eelke M. S. The cafeteria diet: a standardized protocol and its effects on behavior. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, [s. l.], v. 122, p. 92–119, mar. 2021. DOI:https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.003. Acesso em: 26 ago. 2026.

GREGOR, Martin F.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammatory mechanisms in obesity. Annual Review of Immunology, [s. l.], v. 29, p. 415–445, abr. 2011. DOI:https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322. Acesso em: 26 ago. 2026.

BUSE, John B. Overview of the 2009 ADA Scientific Sessions. Diabetes Care, [s. l.], v. 32, supl. 2, p. S155–S156, nov. 2009. DOI:https://doi.org/10.2337/dc09-S302. Acesso em: 26 ago. 2026.

TURNBAUGH, Peter J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature, [s. l.], v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, dez. 2006. DOI:https://doi.org/10.1038/nature05414. Acesso em: 26 ago. 2026.

FLINT, Harry J. et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 289–306, jul./ago. 2012. DOI:https://doi.org/10.4161/gmic.19897. Acesso em: 26 ago. 2026.

TILG, Herbert; KASER, Arthur. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. The Journal of Clinical Investigation, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 2126–2132, jun. 2011. DOI:https://doi.org/10.1172/JCI58109. Acesso em: 26 ago. 2026.

Anexos



Tabela 1: Composição nutricional e densidade calórica estimada da dieta de cafeteria padronizada e termicamente processada utilizada para induzir síndrome metabólica precoce em ratos Wistar machos



Tabela 2: Composição de ingredientes e formulação proporcional da dieta de cafeteria padronizada e termicamente processada administrada a ratos Wistar machos durante a indução experimental da síndrome metabólica



Tabela 3: Sequências de primers, genes-alvo e genes de referência utilizados para a análise de RT-qPCR nos tecidos adiposo e muscular esquelético de ratos Wistar machos experimentais



Tabela 4: Condições de amplificação por PCR e parâmetros de ciclagem térmica utilizados para a preparação da biblioteca genômica para o sequenciamento da microbiota intestinal em amostras fecais de ratos Wistar machos



Tabela 5: Parâmetros antropométricos, classificação do fenótipo de obesidade e índices de adiposidade em ratos Wistar machos submetidos à dieta de cafeteria e/ou administração de estreptozotocina



Tabela 6: Marcadores bioquímicos séricos do metabolismo da glicose, perfil lipídico, função renal e lesão hepática em ratos Wistar machos durante a indução precoce da síndrome metabólica



Tabela 7: Perfil hematológico de ratos Wistar machos submetidos à disfunção metabólica induzida por dieta de cafeteria e estreptozotocina



Tabela 8: Abundância relativa de táxons bacterianos intestinais identificados por sequenciamento Nanopore em amostras fecais de ratos Wistar machos submetidos à disfunção metabólica induzida por dieta de cafeteria



Figura 1: A dieta experimental foi preparada a partir da homogeneização de ração padrão triturada com leite condensado, margarina, óleo de soja, açúcar refinado e biscoito recheado de chocolate. A massa obtida foi espalhada em assadeira untada (espessura



Figura 2: Após 102 dias de intervenção, foram avaliadas as concentrações séricas de IL-1beta e IL-6, bem como a expressão gênica de leptina (tecido adiposo) e Slc2a4/GLUT4 (músculo esquelético) em ratos Wistar machos dos grupos Controle Saudável, STZ, Caf



Figura 3: Fotomicrografias de rim, fígado, baço, pâncreas e tecido adiposo de ratos Wistar após 102 dias mostram arquitetura preservada no grupo Controle e alterações morfológicas associadas à lesão metabólica no grupo Dieta de Cafeteria, incluindo infilt

CÓDIGO: SB0236

AUTOR: JOAO PAULO NASCIMENTO DE MELO

ORIENTADOR: ELIZANGELA EMIDIO CUNHA

TÍTULO: Impacto do tamanho da progênie sobre a endogamia média em tilápias do Nilo selecionadas para o peso corporal no longo prazo

Resumo

Estudou-se o impacto de dois tamanhos da progênie por casal (TP) sobre a endogamia média em tilápias do Nilo *(Oreochromis niloticus)* selecionadas pelo BLUP para o aumento do peso corporal no longo prazo. O genoma foi simulado com 44 cromossomos, 968 cM de comprimento total, contendo QTLs, poligenes e cerca de 40K SNPs. Inicialmente, foi simulada uma população histórica, acasalada ao acaso (AAA) por 100 gerações discretas. Na 100ª geração, foram tomados ao acaso 100 machos (M) e 200 fêmeas (F) para se reproduzirem e formar as duas populações de seleção (cenários) baseada no BLUP, que ocorreu por 20 gerações sobrepostas, sob AAA, visando aumentar o ganho de peso diário (GDP). Foram simulados dois tamanhos de progênie/casal (cenário 1: TP=30 alevinos, 50% M; e cenário 2: TP = 100 alevinos, 50% M). Foi avaliada a endogamia média (Fm) por geração, que aumentou consideravelmente ao longo das gerações, sendo que, a partir da 3ª geração, este aumento foi mais elevado para TP=100 (3,87% vs. 1,81% nos cenários 2 e 1, respectivamente, alcançando na 20ª geração 76,2% vs. 46,2%, respectivamente). No intervalo da 2ª à 20ª geração, a média da Fm foi de 21,3% para TP=30 e 37,4% para TP=100. Nos dois cenários, a seleção pelo BLUP elevou, a partir da 7ª (TP=30) e da 5ª (TP=100) gerações, a Fm para níveis superiores ao nível máximo aceitável (10%) na maioria das espécies de animais de produção, considerando dados de populações reais divulgados na literatura científica.

Palavras-chave: melhoramento genético. metodologia do modelo misto. simulação de dados

TITLE: Impact of progeny size on average inbreeding in Nile tilapia selected for body weight using BLUP in the long-term

Abstract

The impact of two progeny sizes per couple (PS) on the average inbreeding in Nile tilapia *(Oreochromis niloticus*) selected by BLUP to increase the body weight at long- term was studied. The simulated genome contained 44 chromosomes, 968 cM of total length, allocating QTLs, polygenes and around 40K SNPs. At the beginning, a historical population was simulated and mated at random by 100 discrete generations. In the 100th generation, 100 males (M) and 200 females (F) were chosen at random to reproduce and form the two selection populations (scenarios) based on BLUP, that occurred for 20 overlapped generations, under random mating (RAM), aiming to increase the daily weight gain (DWG). Two progeny sizes/couple were simulated (scenario 1: PS=30 fingerlings, 50% M; and scenario 2: PS=100 fingerlings, 50% M). The average inbreeding (Fm) per generation was evaluated, which increased remarkably over the generations, being that, beyond 3rd generation, this increase was higher for PS=100 (3,87% vs. 1,81% in scenarios 2 and 1, respectively, reaching 76,2% vs. 46,2%, respectively, in the 20th generation). From 3rd to 20th generation, the mean of the Fm was 21.3% for PS=30 and 37,4% for PS=100. In both scenarios, the BLUP selection increased, beyond 7th (PS=30) and 5th (PS=100) generations, the Fm for levels higher than the acceptable maximum level (10%) in the most species of production animals, considering data from real populations published in the literature.

Keywords: genetic improvement. mixed model methodology. data simulation

Introdução

No Brasil e no mundo, o melhoramento genético das espécies aquícolas ainda está em sua fase inicial, se comparado ao de outras espécies de animais domésticos terrestres de interesse econômico-produtivo na agropecuária. Os poucos programas de melhoramento aplicados às espécies de peixes continentais estão ou em fase inicial de implantação ou têm poucas gerações de seleção concluídas e se limitam basicamente ao melhoramento da tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)*. Esta tilápia é uma espécie exótica, natural do continente africano, que se adaptou com extrema facilidade às condições ambientais do Brasil, sendo, atualmente, produzida em escala comercial em todas as regiões do nosso país por reunir características desejáveis: alta , tolerância a diferentes salinidades, temperaturas de água e sistemas de produção, exibindo rápido crescimento, carne de ótima qualidade e boa aceitação pelo mercado consumidor (Khaw et al., 2008; Turra et al., 2010).
A tilápia pode ser comercializada na forma de peixe inteiro ou de filé fresco ou congelado, dependendo da preferência do mercado consumidor. O peso corporal apresenta altíssima correlação genética (quase 100%) com o peso do filé (Rutten et al., 2005; Nguyen et al., 2010; Gjerde et al., 2012), mas com a vantagem de poder ser medido no animal vivo. Isso significa que o animal (candidato à seleção) e os seus parentes (pais e irmãos) podem contribuir com o registro fenotípico do seu peso corporal, possibilitando uma maior acurácia e

intensidade de seleção e, portanto, um maior ganho genético por seleção (Gjerde et al., 2012). Além disso, a seleção direta para o aumento no peso corporal da tilápia pode resultar no aumento do peso do filé como resposta correlacionada (seleção indireta), levando-se em conta o fenômeno genético da pleiotropia. Segundo Bourdon (2014), a metodologia BLUP tem sido empregada para a avaliação genética em larga escala, ou seja, de grandes populações de animais domésticos terrestres e aquáticos, porque ela considera as diferenças genéticas entre os diferentes grupos de contemporâneos; e porque, sob o modelo animal, essa metodologia fornece as predições genéticas para todos os animais ao mesmo tempo em que estima os efeitos fixos, que incluem desde os efeitos internos (sexo e idade) bem como os efeitos externos (tipo de manejo, ração) relacionados ao ambiente de cultivo que incidem sobre o peixe. O BLUP inclui todas as informações disponíveis, seja dos candidatos à seleção (no caso de eles terem registro próprio na característica) seja dos seus parentes (do mais próximo ao mais distante), conectando-os geneticamente por meio de uma matriz de parentesco genético aditivo. Mas, isso exige que os peixes sejam individualmente marcados (identificados), o que pode aumentar os custos de um programa de melhoramento genético (Turra et al., 2010). Em muitos países, esta metodologia já vem sendo aplicada nos programas de melhoramento de espécies de interesse na aquicultura, dado que a marcação com microchips tem se tornado economicamente viável.

Como ressaltaram Cunha et al. (2003), a seleção baseada no BLUP proporciona um elevado ganho genético em menor intervalo de tempo, em função do aumento na acurácia de seleção (medida de correlação entre o critério de seleção e os valores genéticos dos indivíduos), conseguido com o uso da informação disponível de todos os parentes do candidato à seleção, o que tem, sobretudo, maior importância na seleção das características de baixa herdabilidade. Todavia, esses autores enfatizaram que o BLUP por si só já ocasiona um aumento nos níveis da endogamia, pois eleva a chance de indivíduos aparentados serem cosselecionados.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a endogamia média por geração em populações de tilápias do Nilo selecionadas para o ganho de peso diário, por meio da metodologia BLUP, ao longo de 20 gerações com sobreposição, considerando dois tamanhos da progênie por casal, em um estudo de simulação computacional.

Metodologia

Foram analisadas informações de duas populações de tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)* obtidas por meio do programa de simulação QMSim (Sargolzaei & Schenkel, 2009), que utiliza o método forward in time. Inicialmente, foi simulado um genoma contendo 44 cromossomos, com comprimento médio por cromossomo de 22 cM, totalizando 968 cM, em que foram alocados 2.904 QTLs (Quantitative Trait Loci) e poligenes, como responsáveis pela expressão fenotípica de uma única característica quantitativa, o ganho de peso diário (GPD) do peixe, para indicar o seu desempenho ponderal. Além disso, foram simulados 39.927 (~ 40K) marcadores genéticos do tipo SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Tanto QTLs quanto marcadores SNPs tiveram dois alelos por

loco (eram bialélicos), com frequências alélicas iguais, e distribuíram-se aleatoriamente pelo genoma. Os efeitos aditivos dos QTLs e dos poligenes seguiram a distribuição normal, enquanto os SNPs não tiveram efeito. A característica GPD teve herdabilidade total de 0,40, ou seja, um valor moderado de herdabilidade, típico das características de desempenho ponderal, sendo que a foi 0,30 e a foi 0,10; e a variância fenotípica foi 1,0.

A primeira população simulada, considerada fundadora, foi uma população histórica contendo 300 peixes por geração (metade de machos), que evoluiu por 100 gerações discretas, sem seleção nem migração, com acasalamentos ao acaso e admitindo-se em seu genoma uma taxa de mutação de 5 X 10-6 tanto para QTLs (mutação pelo modelo alelo infinito) como para SNPs (mutação recorrente). Da primeira à 99ª geração desta população, o número de machos e fêmeas simulados foi igual (150 peixes), acasalados segundo a razão sexual de 1 macho: 1 fêmea. Mas, na 100ª geração, foram simulados 100 machos e 200 fêmeas (razão sexual de 1 macho: 2 fêmeas), que se acasalaram e formaram as populações denominadas de recentes e submetidas à seleção.

A seleção foi baseada no BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) por um período total de 20 gerações (longo prazo) com sobreposição, tendo sido aplicada a duas populações (cenários), conforme o tamanho da progênie (TP) por matriz/reprodutor (ou casal): cenário 1: TP=30 alevinos; e cenário 2: TP=100 alevinos. Não houve perda de alevinos e nem de peixes adultos, ou seja, assumiu-se que a taxa de mortalidade foi nula.

O objetivo da seleção foi aumentar o GPD ao longo das gerações. Em ambos os cenários, houve a seleção e o acasalamento ao acaso de 100 machos com 200 fêmeas por geração (razão sexual de 1 macho: 2 fêmeas). Para caracterizar a sobreposição de gerações, praticou-se a reposição de reprodutores e matrizes nas taxas de 50% e 25%, respectivamente, por geração. No cenário 1, cada fêmea produziu 30 alevinos, totalizando 6.000 alevinos/geração, com igual proporção entre os sexos (3.000 machos e 3.000 fêmeas), configurando o surgimento de 200 famílias de irmãos completos (com 30 alevinos cada) e de 100 famílias de meios-irmãos paternos (com 60 alevinos cada). Já no cenário 2, cada fêmea produziu 100 alevinos, totalizando 20.000 alevinos/geração (10.000 machos e 10.000 fêmeas), distribuídos em 200 famílias de irmãos completos (com 100 alevinos cada) e 100 famílias de meios-irmãos paternos (com 200 alevinos cada).

Considerando todo o período avaliado (20 gerações), o banco de dados do cenário 1 reuniu informações de GPD para 120.000 peixes por repetição; enquanto no cenário 2 o tamanho do banco atingiu 400.000 peixes por repetição. Por cenário, foram efetuadas 30 repetições para reduzir possíveis erros de amostragem, o que resultou na simulação de um banco de dados contendo informações para 3 milhões e 600 mil peixes no cenário 1 e para 12 milhões de peixes no cenário 2. Ressalta-se que, além das informações na característica GPD, os peixes também tiveram o registro simulado para outras variáveis de interesse, entre as quais destacam-se a codificação do pai e da mãe de cada animal o que tem relevância na construção da sua genealogia. Isso permitiu a obtenção da matriz dos relacionamentos de parentesco genético aditivo entre os

animais, conectando-os geneticamente entre as sucessivas gerações, possibilitando a predição do valor genético aditivo de cada peixe e a estimação dos efeitos fixos para os grupos de peixes contemporâneos, de forma simultânea, pelo emprego das equações de modelos mistos por meio do BLUP.

As intensidades de seleção foram diferentes entre os dois sexos, levando-se em conta a razão sexual praticada por geração. Para TP=30 (6.000 alevinos), as intensidades de seleção dos machos (im) e fêmeas (if) foram de 2,23 e 1,94, respectivamente. Já para TP=100 (20.000 alevinos), a intensidade de seleção nos dois sexos correspondeu, respectivamente, a 2,66 (im) e 2,42 (if). Nos dois cenários, o parâmetro avaliado por geração foi a endogamia média (Fm).

Resultados e Discussões

O conjunto de dados analisados foi obtido a partir de simulações que utilizam o método forward in time, o qual exige o fornecimento dos parâmetros iniciais para a obtenção das populações de interesse nas gerações subsequentes (Hoban et al., 2012). Para que os resultados obtidos dos parâmetros pudessem ser interpretados e, se possível, comparados com resultados reais oriundos de programas de melhoramento genético dessa espécie, a arquitetura genômica foi simulada com base em informações reais coletadas da literatura científica sobre a tilápia do Nilo, visando mimetizar com elevada fidedignidade a realidade de campo verificada para esta espécie de peixe, quando mantida sob seleção no longo prazo.

Considerando as duas populações avaliadas (cenários 1 e 2), a resposta à seleção baseada no BLUP foi positiva e crescente para o GPD ao longo de todo o período avaliado, como ficou evidente pelo aumento no valor fenotípico médio/geração (VFM). Por meio da seleção baseada no BLUP, visando o aumento do GPD a cada geração, foram escolhidos, para se acasalar ao acaso e deixar descendentes, os reprodutores e as matrizes que tiveram os mais altos valores genéticos preditos (ou valores reprodutivos estimados) para a característica em foco pelas equações de modelos mistos – a partir do registro fenotípico dos animais para o GPD e da matriz de parentesco genético aditivo entre eles –, respeitando-se a intensidade de seleção em cada sexo.

Neste estudo, as populações de seleção exibiram resultados diferentes para o VFM desde a 2ª geração de seleção, sendo que esta diferença se tornou marcantemente acentuada após a 3ª geração. Ao longo de todo o período de seleção, o VFM foi mais alto no cenário 2, em que cada casal produziu 100 alevinos. Comparativamente, na geração 3, o VFM foi de 1,26 g/dia vs. 1,47 g/dia nos cenários 1 (TP=30) e 2 (TP=100), respectivamente. Na 6ª geração, observou-se 3,04 g/dia vs. 3,60 g/dia; na 12ª geração, 6,20 g/dia vs. 7,16 g/dia; e na 20ª geração, 9,53 g/dia vs. 10,02 g/dia, nos respectivos cenários 1 e 2.

Quanto à endogamia média por geração (Fm) (Figura 01), verificou-se que ela acompanhou a mesma tendência observada para o valor fenotípico

médio/geração (VFM), ou seja, exibiu resultados crescentes ao longo das gerações, mas com maior diferença nos valores entre os dois cenários, tornando-se acentuadamente diferente a partir da 3ª geração, tendo sido mais elevada no cenário 2 (TP=100) do que no cenário 1 (TP=30), flutuando praticamente em torno do dobro no cenário 2, durante todo o período de seleção.

Analisando a endogamia média por geração (Fm), correspondentemente ao que foi feito para o VFM, verificamos que, na geração 3, a Fm foi de 1,81% vs. 3,87% nos cenários 1 (TP=30) e 2 (TP=100), respectivamente. Nesse sentido, considerando os respectivos cenários 1 e 2, na 6ª geração, a Fm alcançou 9,40% vs. 17,51%; na 12ª geração, 24,87% vs. 44,57%; e na 20ª geração, 46,22% vs. 76,19%. Ao longo das 20 gerações de seleção, a média da Fm foi de 21,25% no cenário 1 (TP=30) e de 37,43% no cenário 2 (TP=100). De acordo com Meuwissen & Woolliams (1994), os efeitos detrimentais da endogamia como: redução da variância genética aditiva, o que reduz as taxas de respostas e os valores do limite da seleção não só para a característica alvo de seleção como para outras; depressão por endogamia para a característica sob seleção, sobretudo quando esta for influenciada por efeitos genéticos não-aditivos; e, finalmente, depressão por endogamia na adaptação do animal.

Segundo Falconer & Mackay (1996), se a seleção ocorre no médio e no longo prazos, é importante considerar a depressão por endogamia que, neste caso, reduz a variabilidade genética e, consequentemente, a resposta à seleção. Cunha et al. (2003) ressaltaram que, levando-se em conta tais efeitos prejudiciais no processo de seleção, o grande desafio passa a ser o de reduzir as taxas de endogamia a níveis aceitáveis, no decorrer das gerações ou, de outra forma, tentar otimizar ganhos genéticos em níveis pré-determinados de endogamia.

Quanto ao percentual aceitável da endogamia média, Alcalá et al. (1995) afirmaram que taxas de endogamia superiores a 10% podem ser perigosas, pois colocam em evidência alguns genes recessivos indesejáveis. Logo, admitindo-se, por exemplo, um nível de endogamia média de até 10% por geração, próximo do nível máximo possível de ser tolerado nas diferentes espécies de animais domésticos, verificado na literatura científica, observou-se que este patamar foi ultrapassado logo na 7ª geração do cenário 1 (TP=30) para a qual foi registrado o valor de 11, 92% e um pouco mais cedo, ou seja, na 5ª geração do cenário 2 (TP=100) para a qual foi registrado o valor de 13,15%. Portanto, em ambos os cenários, os efeitos da depressão endogâmica começariam a ser percebidos antes mesmo da primeira metade do período total da seleção.

Como nossos resultados foram obtidos a partir de uma simulação computacional, observamos que, de fato, não houve comprometimento do aumento na característica GPD, ou seja, não houve depressão endogâmica. Assim, considerando os resultados obtidos no cenário 1 (TP=30) e um ciclo de cultivo de 180 dias (06 meses) do nascimento até o abate, praticado na maioria das tilapiculturas, o aumento estimado no peso vivo médio foi de 547,2 g; 1.116 g e 1.715,4 g na 6ª, 12ª e 20ª gerações, correspondentes, nesta ordem, a 3,04 g/dia; 6,20 g/dia e 9,53 g/dia de GPD médio. Analogamente, no cenário 2 (TP=100), a estimativa de aumento no peso vivo médio foi de 648 g; 1.288,8 g e 1.803,6 g na 6ª, 12ª e 20ª gerações, correspondentes, nesta ordem, a 3,60 g/dia;

7,16 g/dia e 10,02 g/dia de GPD médio, também para um ciclo de cultivo de seis meses de duração.

Logo, nossas simulações mostraram que houve uma mudança fenotípica expressiva no peso vivo médio das tilápias submetidas à seleção baseada no BLUP, após 20 gerações de seleção, principalmente para TP=100, apesar de o patamar máximo tolerado (10%) de endogamia ter sido atingido nos dois cenários de forma precoce. Isto se deve ao fato de que as intensidades de seleção dos machos e fêmeas foram mais altas nesta população com maior tamanho da progênie (TP=100) por casal. Ressalta-se que, em ambos os cenários, a quantidade de casais formados (200) assim como a razão sexual (1 macho: 2 fêmeas) foram mantidas constantes, ou seja, o tamanho efetivo de população foi o mesmo, de 266,67, em todas as gerações. Contudo, a escolha dos futuros casais (100 machos: 200 fêmeas) foi feita dentre um conjunto maior de candidatos à seleção no cenário 2 (10.000 machos e 10.000 fêmeas para TP=100) do que no cenário 1 (3.000 machos e 3.000 fêmeas para TP=30), e isto aumentou a chance de se obter mais animais (machos e fêmeas) melhores (conhecidos como “animais top”) em termos do seu valor genético predito entre os potenciais candidatos à seleção (de ambos os sexos) no cenário 2 (TP=100), e que também fossem relacionados geneticamente entre si, do que no cenário 1 (TP=30).

Dado que a sobreposição de gerações ocorreu a uma taxa de 50% para reprodutores e de 25% para matrizes, isto significou, na prática, que a quantidade de machos e de fêmeas repostos por geração foram iguais (50). Assim, do total de 100 reprodutores acasalados, 50 foram aproveitados entre os melhores machos da geração anterior e 50 foram selecionados entre os melhores da geração atual. No caso das matrizes, do total de 200 escolhidas, 150 foram aproveitadas entre as melhores fêmeas da geração anterior e 50 foram selecionadas entre as melhores da geração atual. Isto fez com que a proporção de machos e de fêmeas repostos por geração fossem iguais dentro de cada cenário, ou seja, de 1,7% para machos e fêmeas em TP=30; e de 0,5% para machos e fêmeas em TP=100. Transformando esses valores em números inteiros para fins de comparação, seria como se entre 1.000 animais candidatos potenciais à seleção, tivéssemos de selecionar 17 (TP=30) vs. 5 (TP=100). Isso indica que o rigor na escolha dos melhores animais seria mais alto para o cenário 2 com TP=100. Quanto menor a proporção de animais selecionados, maior a intensidade de seleção; e como a resposta à seleção (ou ganho genético por seleção) é diretamente proporcional à intensidade de seleção, isto fez com que essa resposta fosse mais elevada para TP=100, ao longo das gerações.

Segundo Kinghorn et al. (2006), quando a seleção dos reprodutores e matrizes ocorre entre a progênie recém-nascida, ou seja, quando as gerações são discretas, temos uma estratégia definida como seleção de progênie. Mas, se a escolha ocorrer dentre todos os animais disponíveis para a reprodução, ou seja, pertencentes à geração mais jovem e à geração antecessora, essa estratégia é definida como seleção parental. A seleção parental propicia um ganho genético cerca de 10% superior ao obtido pela seleção de progênie. Isso se explica por conta de um balanço entre as proporções dos animais escolhidos dentre os animais disponíveis nas duas gerações, de modo que menos animais serão

retidos como reprodutores da nova geração se acontecer de ela ser de uma safra ruim; mas, se for de uma safra boa, mais animais jovens serão proporcionalmente retidos, descartando-se aqueles mais velhos. Para tanto, os valores genéticos preditos precisam ser comparáveis entre as classes de idade, como ocorre usando a metodologia BLUP. De modo geral, como afirmado por Bourdon (2014), espera-se que o valor genético médio dos animais de grupos contemporâneos mais jovens seja superior ao dos grupos contemporâneos mais velhos, numa população submetida à seleção por um tempo considerável e com tendência genética positiva.

Conclusão

Nas duas populações de tilápia do Nilo, houve um aumento expressivo na endogamia média por geração para a seleção da característica ganho de peso diário com base no BLUP a longo prazo. Este aumento foi mais elevado na população cujos casais tiveram um tamanho de progênie maior por geração (TP=100), em função de uma maior intensidade de seleção aplicada a ambos os sexos.

Referências

ALCALÁ, A.M.; FRANGANILLO, A.R.; CÓRDOBA, M.V. Analisis genético de los niveles de consanguinidad em la raza Retinta. Archive Zootecnica, v.44, p.257-265, 1995.

BOURDON, R.M. Understanding animal breeding. 2nd Edition. Pearson Education Limited. 2014. 518p.

CUNHA, E.E.; EUCLYDES, R.F.; TORRES, R.A.; LOPES, P.S.; RIBEIRO JR.; J.I.; CARNEIRO, P.C.S. Efeito de tipos de acasalamentos e razões sexuais na seleção baseada no BLUP. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.6, p.1297-1303, 2003.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. Introduction to quantitative genetics. 4.ed. Longman, Essex UK, 1996. 464p.

GJERDE, B.; MENGISTU, S.B.; ODEGARD, J.; JOHANSEN, H.; ALTAMIRANO, D.S. Quantitative genetics of body weight, fillet weight and fillet yield in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Aquaculture, v.342-343, p.117-124, 2012.

HOBAN, S.; BERTORELLE, G.; GAGGIOTTI, O.E. Computer simulations: tools for population and evolutionary genetics. Nature Reviews Genetics, v.13, p.111-122, 2012.

KHAW, H.I.; PONZONI, R.W.; DANTING, M.J.C. Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. Aquaculture, v.275, p.64-69, 2008.

KINGHORN, B.; van der WERF, J.; RYAN, M. [tradução: Vânia Cardoso e Roberto Carvalheiro. Melhoramento animal: uso de novas tecnologias. Piracicaba: FEALQ. 2006. 367p.

MEUWISSEN, T.H.E.; WOOLLIAMS, J.A. Effective sizes of livestock populations to prevent a decline in fitness. Theoretical and Applied Genetics, v.89, p.1019-1026,

1994.

NGUYEN, N.H.; PONZONI, R.W.; ABU-BAKAR, K.R.; HAMZAH, A.; KHAW, H.L.; YEE, H.Y. Correlated response in fillet weight and yield to selection for increased harvest weight in genetically improved farmed tilapia (GIFT strain), Oreochromis niloticus. Aquaculture, v.305, p.1-5, 2010.

RUTTEN, M.J.M.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.). Aquaculture, v.246, p.125-132, 2005.

SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F.S. QMSim: a large-scale genome simulator for livestock. Bioinformatics, v.25, p.680–681, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp045.

TURRA, E.M.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, E.A.; PRADO, S.A.; MELO, D.C.; SOUSA, A.B. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus). Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.34, n.1, p.29-36, 2010.

Anexos



Figura 01

CÓDIGO: SB0240

AUTOR: RIVA DANIELLY DE ARAUJO ALVES

ORIENTADOR: GISLENE MARIA DA SILVA GANADE

TÍTULO: Morfologia polínica de espécies arbóreas utilizadas na restauração ecossistêmica da Caatinga e análise dos recursos polínicos utilizados por Apis Mellifera durante a estação de estiagem.

Resumo

A presente pesquisa analisou os recursos polínicos utilizados por abelhas em uma comunidade restaurada da Caatinga, com ênfase em Apis mellifera durante as estações chuvosa e de estiagem. Também foi caracterizada a morfologia polínica das 16 espécies arbóreas utilizadas no experimento de restauração ecossistêmica BEF-BrazilDry, contribuindo para a construção de uma base de referência dos recursos florais da área. Para isso, foram levantadas informações das espécies a partir de literatura e bases de dados, complementadas por registros das características florais e foliares. Foram realizadas duas campanhas de amostragem, em abril e agosto, correspondentes às estações chuvosa e de estiagem, respectivamente, na Floresta Nacional de Açu,(RN). Os grãos de pólen presentes no tegumento das abelhas foram extraídos e identificados por análise palinológica, com auxílio de literatura e microscopia. Ao todo, foram analisados 24 indivíduos dos gêneros Apis e Megachile, sendo 21 coletados na estação chuvosa e três na estiagem. A estação chuvosa apresentou maior diversidade de morfotipos polínicos. Na estiagem, foram contabilizados 6.800 grãos, dos quais 6.110 foram identificados como Jatropha mollissima, presente nas três amostras. Os resultados evidenciam diferenças na composição dos recursos polínicos entre as estações, com predominância de J. mollissima na estiagem, indicando sua importância como fonte de recursos florais para A. mellifera em períodos de menor disponibilidade de flores.

Palavras-chave: Caatinga. Restauração. Palinologia. Apis. Jatropha. BEF-BrazilDry.

TITLE: Pollen morphology of tree species used in the ecosystem restoration of the Caatinga and analysis of pollen resources used by Apis mellifera during the dry season.

Abstract

This study analyzed the pollen resources used by bees in a restored Caatinga community, focusing on Apis mellifera during the rainy and dry seasons. The pollen morphology of the 16 tree species used in the BEF-BrazilDry ecosystem restoration experiment was also characterized, contributing to a reference database of the area's floral resources. To this end, information on the species was gathered from literature and databases, supplemented by records of floral and foliar characteristics. Two sampling campaigns were conducted—in April and August, corresponding to the rainy and dry seasons, respectively—at the Açu National Forest (RN). Pollen grains found on the bees' bodies were extracted and identified via palynological analysis, using literature and microscopy. A total of 24 individuals from the genera Apis and Megachile were analyzed: 21 collected during the rainy season and three during the dry season. The rainy season showed greater diversity in pollen morphotypes. During the dry season, 6,800 grains were counted; of these, 6,110 were identified as Jatropha mollissima, a species present in all three samples. The results reveal differences in pollen resource composition between the seasons, with a predominance of J. mollissima during the dry season, highlighting its importance as a floral resource for A. mellifera when flower availability is lower.

Keywords: Caatinga. Restoration. Palynology. Apis. Jatropha. BEF-BrazilDry.

Introdução

A Caatinga configura a maior floresta sazonalmente seca das Américas, sendo o único bioma exclusivamente brasileiro e ocupando parte do território nacional. Além de sofrer degradação severa (Antongiovanni et al., 2020), é classificada como um dos biomas mais suscetíveis à perda de área devido a processos associados às mudanças climáticas (Bezerra et al., 2020). Em comparação a outros biomas, é relativamente pouco estudada. Em decorrência disso, sua biodiversidade ameaçada e os serviços ecossistêmicos providos por essas espécies são pouco compreendidos (Melo, 2017; Manhães et al., 2016). Nesse contexto, a Caatinga torna-se cenário para estudos sobre os efeitos da restauração ecossistêmica.

Diferentes processos contribuem para a resiliência ecossistêmica, incluindo interações entre espécies. Comunidades vegetais podem ser estruturadas de modo que a diversidade contribua, por meio da diferenciação de nicho, complementaridade e facilitação. Diferenças funcionais entre espécies permitem diferentes formas de uso dos recursos, aumentando a eficácia da comunidade (Wagg et al., 2017). A facilitação melhora as condições microclimáticas ao redor de uma planta, contribuindo para a germinação, o crescimento e a sobrevivência de outros indivíduos (Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2018; Teixeira et al., 2020).

Outro importante conjunto de interações envolve a polinização, sustentada pelo provimento de recursos florais a espécies polinizadoras, que garantem a reprodução de comunidades vegetais (Fontaine et al., 2006). Estima-se que quase 90% das plantas angiospermas sejam polinizadas por animais, particularmente insetos (Ollerton, 2011). As abelhas destacam-se por serem responsáveis pela polinização de um terço de todos os cultivares humanos (Khalifa et al., 2021), sendo importantes ao funcionamento dos ecossistemas (Garibaldi et al., 2013).

Entre as espécies de abelhas, a espécie exótica e invasora Apis mellifera destaca-se pelo comportamento generalista de forrageamento e pela capacidade de explorar ampla variedade de recursos florais, sendo importante na polinização de espécies cultivadas e nativas (Garibaldi et al., 2013; Khalifa et al., 2021). Essas características tornam a espécie relevante para estudos sobre recursos e interações planta-polinizador em áreas restauradas.

O desaparecimento de insetos polinizadores devido à perda de habitat e à escassez de recursos pode interromper interações ecossistêmicas essenciais à manutenção de comunidades vegetais (Pan et al., 2024). Mudanças climáticas e seus efeitos na composição de espécies também contribuem para a perda de diversidade em comunidades muito conectadas (Burkle, 2013). Projetos de restauração ecossistêmica utilizam esse conhecimento para restaurar seus ecossistemas-alvo e garantir a resiliência das comunidades.

As interações planta-polinizador são temporalmente flexíveis, e a resiliência dessas redes é definida pela capacidade dos polinizadores de explorarem variadas fontes de recursos florais ao longo do tempo e do espaço (Burkle & Alarcón, 2011). Compreender essas interações permite propor estratégias de manejo para projetos de restauração que considerem a facilitação, a complementaridade e a oferta de recursos florais para grupos estratégicos de polinizadores.

Neste trabalho, propõe-se identificar os tipos polínicos presentes nas cargas de pólen de A. mellifera coletadas na estiagem em uma comunidade restaurada da Caatinga. Adicionalmente, elaborou-se um catálogo da morfologia do pólen das espécies arbóreas utilizadas na restauração ecossistêmica da área experimental, com base na literatura especializada, contribuindo para o referencial do experimento BrazilDry. Busca-se, ainda, descrever a ocorrência do pólen de J. mollissima nas amostras analisadas, contribuindo para o conhecimento das interações entre A. mellifera e a flora regenerante de áreas restauradas.

Metodologia

Área de estudo

O estudo foi realizado no experimento Brazil Dry (5°32’17”S - 36°57’49”W), com 3,3 hectares localizado na Floresta Nacional de Açu (FLONA de Açu) Município de Açu-RN (Anexo 1). Este experimento faz parte de uma rede mundial de experimentos focados nas relações entre a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas. O experimento foi estabelecido em 2016 em uma área degradada de floresta tropical sazonalmente seca (domínio biogeográfico da caatinga). O experimento consiste em 155 parcelas (8 x 13 m) com cinco níveis de riqueza de espécies vegetais (um, dois, quatro, oito e dezesseis espécies), diversas composições de espécies e diferentes níveis de potencial de facilitação. Em cada parcela, 32 mudas de 16 espécies arbóreas foram plantadas. O número total de indivíduos utilizados no experimento é o mesmo para todas as espécies (N = 294). No total, o experimento incluiu, 4704 indivíduos de plantas arbóreas. Na área do experimento ocorrem também plantas herbáceas nascidas espontaneamente que também servem de fonte de recurso para as abelhas.

Delineamento Amostral:

A coleta das abelhas foi realizada durante duas campanhas de amostragem na estação chuvosa e na seca, no perímetro e nos arredores da área do experimento . As amostragens ocorreram nos períodos entre 06h00 e 10h30 e entre 14h30 e 17h00. Nos meses de abril sendo caracterizado como estação chuvosa e em agosto como estação seca. Foi realizada uma metodologia ativa de captura com auxílio de puçá entomológico. Nas parcelas experimentais, compostas por 32 plantas, realizou-se uma busca ativa de cinco minutos por planta para captura das espécies de abelhas visitantes. Foi realizada uma busca ativa nas áreas aos arredores do experimento para registrar plantas no período de floração que pudessem ser utilizadas como fontes de recursos florais para as abelhas.

Os espécimes foram armazenados em frascos numerados, separados por espécies. Posteriormente, em laboratório, ocorreu a identificação até o nível mais específico possível. O pólen presente no tegumento de cada espécime foi extraído através do uso de palitinhos embebidos com uma mistura de: gelatina em folha 10g, água destilada 40 ml, glicerina pura 3 ml, fenol 2 g e colorida com fucsina para melhor análise (Erdtman, 1952). Esta metodologia foi comprovadamente eficaz na análise de interações entre morcegos nectarívoros e plantas da caatinga (Cordero-Schmidt et al., 2021). Em seguida, foram confeccionadas lâminas com as amostras de pólen para identificação até o nível mais específico possível das espécies vegetais. A identificação

taxonômica do pólen ocorreu por meio de buscas de artigos contendo o nome das espécies vegetais presentes no experimento e seguida do termo palynology nos sites como da SciELO, Google Acadêmico e ResearchGate. Foi realizado também o uso de microscópio de varredura eletrônica, para a melhor identificação visual dos pólens (Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais, Departamento de Engenharia de Materiais – DEMat, UFRN, Natal, RN). Em seguida, as amostras de pólen foram agrupadas de acordo com sua respectiva planta arbórea e foi criado um documento para a sua identificação.

Análises:

Foi realizada uma análise descritiva dos dados, com o objetivo de identificar os tipos polínicos presentes nas amostras e descrever os recursos florais utilizados por Apis mellifera, com ênfase em Jatropha mollissima.

Resultados e Discussões

Foram inventariadas e caracterizadas, quanto aos aspectos morfológicos polínicos, florais e foliares, as 16 espécies arbóreas utilizadas no experimento de restauração da Caatinga: Amburana cearensis, Anadenanthera colubrina, Aspidosperma pyrifolium, Bauhinia cheilantha, Cenostigma bracteosum, Cochlospermum vitifolium, Combretum leprosum, Commiphora leptophloeos, Cynophala hastata, Handroanthus impetiginosus, Libidibia ferrea, Mimosa tenuiflora, Piptadenia retusa, Pseudobombax marginatum, Sarcomphalus joazeiro e Sebastiania macrocarpa. Além dessas espécies, foi caracterizada Jatropha mollissima, identificada nas cargas polínicas das abelhas analisadas. As informações referentes à morfologia polínica, floral e foliar foram obtidas a partir de literatura especializada e bases de dados, incluindo SciELO, Google Acadêmico, ResearchGate e iNaturalist, complementadas por observações e registros realizados em campo. A partir dessas informações, foi elaborado um catálogo / prancha de referência contendo as características das espécies estudadas (Anexo 2, 3 e 4).

No total, foram analisados 24 indivíduos de abelhas pertencentes aos gêneros Apis e Megachile, sendo 21 coletados durante a estação chuvosa (13 indivíduos de Apis mellifera e 8 de Megachile) e três indivíduos de Apis mellifera durante a estação de estiagem. A análise palinológica revelou maior diversidade de morfotipos polínicos nas amostras coletadas na estação chuvosa, indicando maior diversidade de recursos florais disponíveis nesse período. (Anexo 6 tabela 1).

Apis mellifera foi a única espécie registrada em ambas as estações, permitindo comparar a utilização de recursos florais entre os períodos do ano. Na estação de estiagem foram contabilizados 6.800 grãos de pólen. Destes, 6.110 pertenciam ao morfotipo 20, identificado como Jatropha mollissima (Figura 5), e 290 ao morfotipo 7, identificado como Cochlospermum vitifolium (Anexo 6 tabela 1). Durante as observações em campo, também foram registradas abelhas jandaíras (Melipona subnitida) visitando alguns indivíduos floridos de Cochlospermum vitifolium. Esses indivíduos não foram incluídos na análise palinológica, pois não foi possível realizar a coleta das abelhas. Entretanto, essa observação sugere que Cochlospermum vitifolium também pode atuar como recurso floral para abelhas nativas na área restaurada. O morfotipo 20 esteve presente nas três amostras analisadas, evidenciando a predominância de Jatropha mollissima como recurso polínico durante a seca.

A ocorrência frequente de Jatropha nas cargas polínicas de Apis durante a estação de estiagem sugere que essa espécie desempenha importante papel como fonte de recursos florais quando a disponibilidade de plantas em floração é reduzida. Em contraste, na estação chuvosa observou-se maior diversidade de morfotipos polínicos, indicando a utilização de uma maior variedade de recursos florais por Apis. Esse padrão é compatível com a ampla capacidade de exploração de recursos florais dessa espécie e com sua reconhecida importância como polinizadora em ecossistemas naturais e agrícolas (Garibaldi et al., 2013; Khalifa et al., 2021). Além disso, a menor predominância de Jatropha na estação chuvosa pode estar relacionada à maior diversidade de recursos florais utilizados nesse período.

Os espécimes de Megachile, registrados apenas na estação chuvosa, também apresentaram elevada diversidade de morfotipos polínicos. Por se tratarem de abelhas nativas, podem apresentar associações ecológicas mais estreitas com a flora da Caatinga, explorando uma maior variedade de recursos florais disponíveis. Embora o presente estudo não permita comparar diretamente o comportamento de forrageamento entre os gêneros, esses resultados reforçam a importância das abelhas nativas na manutenção das interações planta-polinizador evolutivamente tradicionais em áreas restauradas. Entretanto, considerando o reduzido número de indivíduos amostrados na estação seca, os resultados apresentados devem ser interpretados como descritivos, fornecendo informações iniciais sobre o uso de recursos florais por abelhas em áreas restauradas da Caatinga.

Os resultados também mostram que diferentes espécies vegetais podem atuar como fontes de recursos florais ao longo do ano, variando conforme a sazonalidade. Nesse contexto, o inventário dos grãos de pólen utilizados por polinizadores representa uma ferramenta importante para compreender as interações entre plantas e abelhas em projetos de restauração da Caatinga. O

conhecimento sobre as espécies vegetais mais utilizadas pode auxiliar na seleção de plantas que garantam oferta contínua de recursos florais, contribuindo para o estabelecimento e a manutenção das comunidades de polinizadores.

Conclusão

O presente estudo mostrou diferenças na composição dos recursos polínicos utilizados pelas abelhas entre as estações chuvosa e de estiagem em uma comunidade restaurada da Caatinga. Apis mellifera foi registrada em ambos os períodos, apresentando predominância de Jatropha mollissima nas amostras da estação seca, enquanto na estação chuvosa foi observada maior diversidade de morfotipos polínicos. A maior ocorrência de abelhas durante a estação chuvosa e a predominância de Jatropha mollissima nas amostras da estiagem evidenciam a influência da sazonalidade na disponibilidade e utilização dos recursos florais.

A ocorrência predominante de Jatropha mollissima durante a estiagem sugere que essa espécie pode representar uma importante fonte de recursos florais para a Apis mellifera em períodos de menor oferta floral. Além disso, a caracterização dos morfotipos polínicos contribuiu para o conhecimento dos recursos utilizados pelas abelhas e para a construção de uma base de referência da flora associada ao experimento de restauração.

Dessa forma, torna-se importante ampliar o mapeamento dos recursos florais utilizados por Apis mellifera e pelas espécies nativas ao longo do ano, permitindo investigar possíveis padrões de sobreposição e especialização no uso desses recursos, bem como suas implicações para as interações planta-polinizador. Essa abordagem pode contribuir para o conhecimento, a conservação das interações entre a vegetação e as abelhas nativas. Nossos resultados ajudam a viabilizar estratégias de restauração que favoreçam a disponibilidade de recursos florais e a manutenção de comunidades de polinizadores na Caatinga, além de contribuir para uma atividade apícola mais resiliente.

Referências

ANTONGIOVANNI, M. et al. 2020. Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. Journal of Applied Ecology, 00:1–11.

BEZERRA, F.G.S. et al. 2020. Analysis of areas undergoing desertification, using EVI2 multi-temporal data based on MODIS imagery as an indicator. Ecological Indicators, 117: 106579.

BOSCH, J., Martín González, AM, Rodrigo, A. e Navarro, D. (2009), Redes planta-polinizador: adicionando a perspectiva do polinizador. Ecology Letters, 12: 409-419.

BURKLE, Laura A.; ALARCÓN, Ruben. The future of plant–pollinator diversity: understanding interaction networks across time, space, and global change. American Journal Of Botany, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 528-538, mar. 2011. Wiley. http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1000391.

BURKLE, Laura A.; MARLIN, John C.; KNIGHT, Tiffany M.. Plant-Pollinator Interactions over 120 Years: loss of species, co-occurrence, and function. Science, [S.L.], v. 339, n. 6127, p. 1611-1615, 29 mar. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.1232728.

FAGUNDES M, Weisser W, Ganade G (2018) The role of nurse successional stages on species-specific facilitation in drylands: Nurse traits and facilitation skills. Ecology and Evolution 8:5173–5184

FONTAINE C, Dajoz I, Meriguet J, Loreau M (2006) Functional Diversity of Plant–Pollinator Interaction Webs Enhances the Persistence of Plant Communities. PLoS Biol 4(1): e1. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040001

GARIBALDI, L. A. et al. Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. Science, v. 339, n. 6127, p. 1608-1611, 28 fev. 2013. http://dx.doi.org/10.1126/science.1230200

KHALIFA, Shaden A. M.; ELSHAFIEY, Esraa H.; SHETAIA, Aya A.; EL-WAHED, Aida A. Abd; ALGETHAMI, Ahmed F.; MUSHARRAF, Syed G.; ALAJMI, Mohamed F.; ZHAO, Chao; MASRY, Saad H. D.; ABDEL-DAIM, Mohamed M.. Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. Insects, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 688, 31 jul. 2021. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/insects12080688.

MANHÃES, A.P. et al. 2016. Spatial associations of ecosystem services and biodiversity as a baseline for systematic conservation planning. Diversity and Distribution, 22:932-942.

MELO, Felipe P. L.. The Socio-Ecology of the Caatinga: Understanding How Natural Resource Use Shapes an Ecosystem. In: SILVA, José Maria Cardoso da; LEAL, Inara R.; TABARELLI, Marcelo. Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. Springer, 2017. p. 369-382.

OLLERTON, Jeff; WINFREE, Rachael; TARRANT, Sam. How many flowering plants are pollinated by animals? Oikos, [S.L.], v. 120, n. 3, p. 321-326, 21 fev. 2011. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x.

PAN, Kaixuan; MARSHALL, Leon; SNOO, Geert R. de; BIESMEIJER, Jacobus C.. Dutch landscapes have lost insect-pollinated plants over the past 87 years. Journal Of Applied Ecology, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 1323-1333, 8 abr. 2024. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.14649.

PATERNO GB, Siqueira Filho JA, Ganade G (2016) Species-specific facilitation, ontogenetic shifts and consequences for plant community succession Pugnaire, F, editor. Journal of Vegetation Science 27:606–615

TEIXEIRA LH, Oliveira BF, Krah F-S, Kollmann J, Ganade G (2020) Linking plant traits to multiple soil functions in semi-arid ecosystems. Journal of Arid Environments 172:104040

WAGG C, Ebeling A, Roscher C, Ravenek J, Bachmann D, Eisenhauer N, Mommer L, Buchmann N, Hillebrand H, Schmid B, Weisser WW (2017) Functional trait dissimilarity drives

both species complementarity and competitive disparity Sayer, E, editor. Functional Ecology 31:2320–2329

WHIPPLE, Sarah; BOWSER, Gillian. The buzz around biodiversity decline: detecting pollinator shifts using a systematic review. Iscience, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 108101, nov. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2023.108101.

INATURALIST. Plataforma iNaturalist. Disponível em: <inaturalist.org>. Acesso em: 1 ago. 2026.

Anexos



Figura 1 - Mapa do Experimento de Restauração.



Anexo 2- 1 Bauhinia cheilantha;2 Libidibia ferrea;3 Anadenanthera colubrine;4 Cochlospermum vitifolium;5 Cynophalla;6 Amburana cearensis.



Anexo 3- 6 Amburana cearensis; 7 Aspidosperma pyrifolium; 8 Combretum leprosum; 9 Piptadenia retusa; 10 Handroanthus impetiginosus; 11 Commiphora leptophloeos; 12 Mimosa.



Anexo 4- 13 Jatropha mollissima; 14 Sebastiania; 15 Poincianella gardneriana 16 Pseudobombax marginatum; 17 Ziziphus joazeiro.



Anexo 5 - morfotipos de grão de pólen 20 (Jatropha mollissima) e 7 (Cochlospermum vitifolium)



CÓDIGO: SB0243

AUTOR: ANA PAULA SANTOS OLIVEIRA

COAUTOR: RAIANE VITAL DA PAZ

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Inteligência artificial e biodiversidade: Como o BirdNET pode aprimorar o monitoramento de aves noturnas em remanescentes da Mata Atlântica?

Resumo

A bioacústica estuda a produção e a recepção de sons em animais, sendo um campo de estudo capaz de auxiliar pesquisas sobre biodiversidade, impacto ambiental e atividades antropogênicas. Considerando a importância ecológica das aves, propõe-se analisar a eficácia da ferramenta BirdNet no que diz respeito à identificação de aves noturnas em regiões de Mata Atlântica situadas nos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba. Inicialmente, foram baixados áudios que possuíam as vocalizações desejadas, depois, com o uso da aplicação Audacity, esses sons foram recortados a fim de formar um banco de dados. Posteriormente, foi feito um treinamento de máquina para que o BirdNet reconhecesse as vocalizações no processo de análise. Como resultados, foram analisados dados do Evaluation 50 e Evaluation 95. Em ambos os cenários, obteve-se um alto percentual de reconhecimento para espécies como Antrostomus rufus e Nyctidromus albicollis; porém, essa taxa diminui em outros grupos de aves, como Nyctibius griseus, Podager nacunda e Bubo virginianus. Assim, conclui-se que, apesar de o modelo trabalhado ter apresentado resultados positivos, o BirdNet alcançou uma eficácia inferior à esperada devido à baixa identificação de algumas espécies.

Palavras-chave: Bacurau, Bioacústica, Coruja, Monitoramento Acústico Passivo

TITLE: Artificial Intelligence and Biodiversity: How Can BirdNET Improve the Monitoring of Nocturnal Birds in Remnants of the Atlantic Forest?

Abstract

Bioacoustics studies sound production and reception in animals, serving as a field capable of supporting research on biodiversity, environmental impact, and anthropogenic activities. Given the ecological importance of birds, this study aims to analyze the effectiveness of the BirdNet tool in identifying nocturnal birds within Atlantic Forest regions in the states of Rio Grande do Norte and Paraíba. Initially, audio recordings containing the target vocalizations were downloaded; subsequently, the Audacity application was used to trim these sounds and create a dataset. Machine training was then conducted to enable BirdNet to recognize the vocalizations during analysis. The results involved an analysis of data from the "Evaluation 50" and "Evaluation 95" sets. In both scenarios, a high recognition rate was achieved for species such as *Antrostomus rufus* and *Nyctidromus albicollis*; however, this rate was lower for other bird groups, such as *Nyctibius griseus*, *Podager nacunda*, and *Bubo virginianus*. Thus, it is concluded that, although the model yielded positive results, BirdNet's overall effectiveness was lower than expected due to the poor identification of certain species.

Keywords: Nightjar, Bioacoustics, Owl, Passive Acoustic Monitoring

Introdução

A paisagem sonora corresponde ao conjunto de sons que compõem um determinado ambiente, incluindo tanto os produzidos por organismos vivos quanto os originados de processos físicos naturais (Dröge et al., 2021; Jaszczak et al., 2021; Scarpelli et al., 2021). De modo geral, esses sons podem ser classificados em três categorias principais: biofonia, composta pelos sons emitidos pelos organismos vivos; geofonia, composta por sons gerados por fenômenos naturais não biológicos, como vento e chuva; antropofonia, que engloba os ruídos produzidos pelas atividades humanas (Farina et al., 2014). Nesse contexto, a bioacústica dedica-se ao estudo da produção, transmissão e recepção dos sons emitidos pelos animais, considerando esses sinais acústicos como importantes mecanismos de comunicação e troca de informações entre indivíduos. (Francescoli, 2021). Além de ampliar o conhecimento sobre a comunicação animal, esse campo de estudo contribui para pesquisas voltadas à avaliação da biodiversidade e dos impactos ambientais das atividades humanas sobre os ecossistemas (Penar; Magiera e Klocek, 2020).

Entre os diferentes grupos animais, as aves destacam-se por utilizarem sinais acústicos em diversas atividades, como defesa de território, atração de parceiros e manutenção das interações sociais. Entretanto, alterações na paisagem sonora, principalmente decorrentes do ruído antropogênico, podem modificar suas vocalizações e comprometer processos ecológicos relacionados à comunicação (Herrera-Montes & Aide, 2011; Gomes et al., 2022). Nesse cenário, o Monitoramento Acústico Passivo (PAM) consolidou-se como uma abordagem não invasiva capaz de registrar continuamente a paisagem sonora, permitindo o levantamento de espécies e o monitoramento da biodiversidade ao longo do tempo (Pugliano, 2021; Sugai et al., 2019; Shen et al., 2026). Além disso, o monitoramento acústico possibilita investigar aspectos como comportamento, diversidade, fenologia e dinâmica populacional por meio de amostragens de alta resolução temporal (Llusia et al., 2013; Tucker et al., 2014; Sugai & Llusia, 2019).

Apesar de suas vantagens, o PAM gera grandes volumes de gravações, tornando a identificação manual das vocalizações um processo demorado e oneroso (Priyadarshani, Marsland & Castro, 2018). Nesse contexto, ferramentas baseadas em inteligência artificial têm sido desenvolvidas para automatizar a identificação de espécies a partir de gravações sonoras. Entre elas destaca-se o BirdNET, desenvolvido por Kahl et al. (2021), que emprega algoritmos de aprendizado de máquina para reconhecer automaticamente vocalizações de aves, reduzindo o tempo de processamento e aumentando a eficiência das análises.

Embora o BirdNET tenha apresentado elevado desempenho para diversas espécies de aves, sua aplicação em espécies de hábitos noturnos ainda permanece pouco explorada, principalmente devido à menor disponibilidade de gravações de referência e ao reduzido número de estudos voltados a esse grupo. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do BirdNET na detecção automática de espécies de aves noturnas registradas em áreas de Mata Atlântica nos estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba, buscando verificar seu potencial como ferramenta de apoio ao monitoramento acústico desse grupo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar a capacidade do BirdNet de reconhecer vocalizações de aves noturnas em cinco fragmentos do Rio Grande do Norte e da Paraíba.

Objetivos específicos

- Selecionar vocalizações de aves das famílias Caprimulgidae (bacuraus) e Strigidae (corujas) no banco de dados do WikiAves.
- Processar áudios de vocalizações no BirdNet para treinamento de máquina e análise dos arquivos.
- Avaliar manualmente se as análises feitas pelo BirdNet estão corretas e se há possíveis limitações encontradas durante o processamento.

Metodologia

Área de estudo e coleta de dados

As áreas de estudo foram a Mata Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN), Flona de Nísia Floresta, Engenho Mucambo e a Mata de Pipa, situadas no Rio Grande do Norte, e o Açude dos Reis, situado na Paraíba. Segundo IBGE (2025),

os locais citados pertencem à porção de Mata Atlântica dos estados em que estão presentes.

Os pontos amostrais foram separados por, no mínimo, 500 m entre si para que as amostras fossem independentes. As gravações foram feitas entre setembro e dezembro de 2022. As gravações ocorreram no período entre 17:00 - 05:00, por três dias consecutivos.

Treinamento

Inicialmente, foi realizada a obtenção das vocalizações das espécies-alvo na plataforma de ciência-cidadã WikiAves (https://www.wikiaves.com.br/). Para a composição do banco de treinamento, foram selecionadas preferencialmente gravações com boa qualidade acústica, minimizando a presença de ruídos e sobreposição de vocalizações.

Em seguida, as gravações foram editadas no software Audacity (https://www.audacityteam.org/), no qual foram removidos ruídos indesejados, como os de chuva, vento e vocalizações de outras espécies, de modo a isolar as vocalizações das espécies-alvo. Posteriormente, cada vocalização foi segmentada em trechos de até três segundos de duração e salva em formato de áudio na pasta destinada ao treinamento. Os arquivos foram organizados em subpastas, cada uma correspondente a uma espécie, conforme a estrutura exigida pelo BirdNET para o treinamento de modelos personalizados.

Após a organização do banco de dados, foi realizada a etapa de treinamento utilizando o BirdNET. Nessa etapa, foram selecionados a pasta contendo as vocalizações previamente processadas e o diretório de saída destinado ao armazenamento dos arquivos do modelo treinado (Class). Durante esse processo, o algoritmo utilizou as vocalizações fornecidas para aprender os padrões acústicos característicos de cada espécie, gerando um modelo capaz de reconhecê-las automaticamente em novas gravações.

Concluído o treinamento, realizou-se a etapa de análise em lote (Batch Analysis), na qual o modelo treinado foi aplicado às gravações obtidas em campo. Nessa etapa, o BirdNET analisa automaticamente os arquivos de áudio, comparando as vocalizações detectadas com os padrões acústicos aprendidos durante o treinamento, permitindo identificar as espécies-alvo presentes nas gravações.

Métricas de desempenho do BirdNET

O desempenho do modelo treinado foi avaliado por meio das métricas Accuracy (Acurácia), Precision (Precisão), Recall (Sensibilidade), F1-score e Average Precision (AP), amplamente empregadas na avaliação de algoritmos de classificação automática de vocalizações (Kahl et al., 2021).

A Accuracy representa a proporção total de classificações corretas realizadas pelo modelo, considerando tanto os verdadeiros positivos quanto os verdadeiros negativos. Entretanto, em conjuntos de dados desbalanceados, essa métrica deve ser interpretada com cautela, pois valores elevados podem mascarar dificuldades na detecção das espécies de interesse.

A Precision indica a confiabilidade das detecções realizadas pelo algoritmo, correspondendo à proporção de vocalizações identificadas como pertencentes a determinada espécie que foram efetivamente classificadas de forma correta. Valores elevados de Precision indicam baixa ocorrência de falsos positivos. Por outro lado, o Recall expressa a capacidade do modelo em detectar as vocalizações realmente presentes nas gravações, sendo influenciado pela ocorrência de falsos negativos. Dessa forma, enquanto a Precision avalia a confiabilidade das detecções, o Recall indica o quanto o algoritmo consegue recuperar das vocalizações existentes.

O F1-score corresponde à média harmônica entre Precision e Recall, sendo utilizado como uma medida de desempenho global do modelo. Essa métrica torna-se particularmente importante quando há um equilíbrio desejável entre minimizar falsas detecções e reduzir a quantidade de vocalizações não detectadas.

Por fim, a Average Precision (AP) resume o desempenho do classificador, considerando simultaneamente os valores de Precision e Recall em diferentes limiares de confiança, sendo considerada uma medida mais robusta da capacidade de discriminação do modelo do que a avaliação em um único limiar de decisão. Para todas as métricas empregadas, valores próximos de 1 indicam melhor desempenho do classificador.

Resultados e Discussões

Para análise de resultados, foram utilizados dados obtidos a partir dos Evaluation 50 e 95 de cada espécie. Esses valores indicam a porcentagem de certeza que o BirdNet possuía no momento em que selecionou as vocalizações. Nesse sentido, são interpretados como a quantidade de seleções que o BirdNet possuía 50% e 95% de certeza ao selecionar os sons.

O presente estudo revelou que no Evaluation 50 (Figura 1), o BirdNet conseguiu identificar para *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis* 70% e 69% das vocalizações, respectivamente. Para *Megascops choliba* e *Asio clamator*, esses percentuais foram de 64% e 60%, respectivamente, sendo as vocalizações de *Asio clamator* caracterizadas como alternativas. Para *Nyctibius griseus* e *Podager nacunda*, os resultados foram de 2% e 50%, nesta ordem. Já o *Bubo virginianus* obteve o menor resultado, com 0%.

Em relação ao Evaluation 95 (Figura 2), *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis* foram de 65% e 69%, respectivamente. E para *Megascops choliba* e *Asio clamator* (vocalização alternativa) os números diminuíram para 44% e 40%. Para o *Nyctibius griseus*, o resultado continuou como 2%. Porém, *Podager nacunda* e *Bubo virginianus* obtiveram 0% de identificações.

A partir disso, observa-se que os melhores resultados foram em *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis*, devido à alta taxa de identificação pela máquina nos dois Evaluations. *Megascops choliba* e *Asio clamator* apresentaram valores medianos. Já *Nyctibius griseus*, *Bubo virginianus* e *Podager nacunda* foram as espécies menos identificadas no modelo.

O modelo não atingiu um bom resultado no geral, mas possuía potencial de tê-lo alcançado, devido a resultados bons para espécies como *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis*. O baixo resultado se deve ao fato de espécies como *Nyctibius griseus*, *Bubo virginianus* e *Podager nacunda* não terem sido identificadas a quantidade de vezes como era esperado.

De acordo com os valores de cada espécie no modelo, o Evaluation 50 (tabela 1) apresentou para *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis* uma precisão de 99% e 100%, respectivamente. Porém, o recall (porcentagem de vocalizações não selecionadas pela máquina) foi de 70% e 69%, cada. Para as demais espécies, ocorreu a mesma situação, uma precisão e um recall altos. Com exceção do Nyctibius griseus que obteve um recall muito baixo, sendo ele de 1,8%.

Os valores atribuídos às aves no Evaluation 95 (tabela 2) foram de 100% de precisão para *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis*. Em relação ao recall, *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis* seguem sendo as espécies com os maiores percentuais, 65% e 69%, nessa ordem. As demais espécies adquiriram valores parecidos, sendo a precisão da maioria 100%, com exceção de *Bubo virginianus* e *Podager nacunda*, que possuem valores nulos. O *Nyctibius griseus* e o *Podager nacunda* foram os que apresentaram menor recall, com 1,8% e 0%, respectivamente.

Ao comparar os valores, podemos perceber que, apesar da alta precisão atingida por algumas espécies (tabelas 1 e 2), essas mesmas tiveram muitos sons que foram ignorados pela máquina, como no caso de *Antrostomus rufus* e *Nyctidromus albicollis*. Isso se mostra na alta quantidade de recall que essas espécies atingiram com o modelo (tabelas 1 e 2). Mesmo que o recall tenha sido baixo para alguns no quadro de valores, como foi o caso do *Nyctibius griseus* (tabelas 1 e 2), os dados das Figuras 1 e 2, nos mostram que a máquina selecionou poucas vocalizações dessa espécie, o que demonstra uma baixa eficiência do modelo.

Os dados do presente trabalho foram apresentados em nível de vocalização, demonstrando os resultados individuais de cada espécie. Percebe-se que, quanto maior o limiar de confiança (0,5 e 0,95), menor é a proporção de verdadeiros positivos e maior a proporção de falsos negativos.

Assim como o trabalho atual, Funosas et al. (2026) também analisaram espécies bioacusticamente utilizando o BirdNet, porém com limiares de confiança de 0,1, 0,5 e 0,75 e aferiram que quando o limiar de confiança aumenta, os valores de verdadeiros positivos e falsos positivos diminuem e os falsos negativos aumentam. Outros artigos mostram que as espécies das Américas Central e do Sul apresentaram resultados mais significativos em níveis de vocalização no que se diz respeito à taxa de falsos positivos, mesmo que com o aumento da confiabilidade haja a diminuição de verdadeiros positivos e aumento de falsos negativos (Funosas et al., 2026).

Esse resultado pode ocorrer devido ao fato de que quanto mais confiança o BirdNet tem ao selecionar as vocalizações, menor será a quantidade de sons corretos e maior a quantidade daqueles marcados incorretamente. Outro ponto a se destacar é que, na presente pesquisa, há resultados negativos para a maioria das espécies, mas em outro estudo mostra que grande parte das espécies das Américas Central e do Sul se saíram melhor em relação a outros continentes (Funosas et al., 2026). Há a possibilidade de a

discrepância entre os resultados ser devida ao fato de as pesquisas serem realizadas com espécies diferentes, apesar de abrangerem o mesmo continente. Existe também a possibilidade de cada espécie responder de forma diferente às metodologias estudadas, os limiares de confiança dependem das espécies (Funosas et al., 2026).

Conclusão

A partir dos resultados observados no presente estudo, conclui-se que o treinamento apresentou um resultado satisfatório para espécies como Antrostomus rufus e Nyctidromus albicollis, mas não apresentou um efeito tão bom em outras espécies. A partir dessa análise, para aqueles indivíduos em que os valores de verdadeiros positivos são menores que os de falsos negativos, é aconselhável melhorar o treinamento, aumentando o número de vocalizações no banco de dados, com o intuito de aperfeiçoar a percepção do BirdNet em relação às espécies apresentadas a ele.

Referências

DRÖGE, S., MARTIN, D., … R. A.-E., & 2021, U. (2021). Listening to a changing landscape: Acoustic indices reflect bird species richness and plot-scale vegetation structure across different land-use types in north. Elsevier.

FARINA, A., JAMES, P., BOBRYK, C., PIERETTI, N., LATTANZI, E., & MCWILLIAM, J. (2014). Low cost (audio) recording (LCR) for advancing soundscape ecology towards the conservation of sonic complexity and biodiversity in natural and urban landscapes. Urban Ecosystems, 17(4), 923–944. https://doi.org/10.1007/s11252-014-0365-0

FRANCESCOLI, G. Presenting Bioacoustics in Ethology. In: OTTA, E.; MONTICELLI, P. F. (orgs). **Acoustic communication: an interdisciplinary approach**. São Paulo, Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2021. Disponível em: https://www.livrosabertos.abcd.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/view/647/576/2191. Acesso em: 15 de jul. de 2026.

FUNOSAS, David et al (2026). A global assessment of BirdNET performance: Differences among continents, biomes, and species. **Ecological Indicators**, 182, 114550. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.114550

GOMES, L. et al (2022). Influence of anthropogenic sounds on insect, anuran and bird acoustic signals: a meta-analysis. Frontier in Ecology and Evolution. 10, 827440, 1-10. DOI:https://doi.org/10.3389/fevo.2022.827440

HERRERA-MONTES, M. I.; AIDE, T. M (2011). Impacts of traffic noise on anuran and bird communities. Urban Ecosystems. 14, 415-427. Disponível em: https://scispace.com/pdf/impacts-of-traffic-noise-on-anuran-and-bird-communities-4alsxhdbvs.pdf

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Domínios Naturais do Brasil.** IBGE, 2025. 1 Mapa. Escala de 1:18.000.000. Disponível em: https://geoftp.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/estudos_ambientais/biomas/dominios_regioes_naturais_do_brasil/2025/mapas/dmRgNtTrBmBr_v2025_mapaDominios_e18MI.pdf. Acesso em: 15 de jul. de 2026.

JASZCZAK, A., MAŁKOWSKA, N., KRISTIANOVA, K., BERNAT, S., & POCHODYŁA, E. (2021). Evaluation of soundscapes in urban parks in Olsztyn (Poland) for improvement of landscape design and management. Mdpi.Com. Evaluation of soundscapes in urban parks in Olsztyn (Poland) for improvement of landscape design and management. Mdpi.Com.

KAHL, S. et al (2021). BirdNET: A deep learning solution for avian diversity monitoring. Ecological Informatics. 61, 101236, 1-10. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2021.101236

LLUSIA, D., MÁRQUEZ, R., BELTRÁN, J. F., BENÍTEZ, M. & DO AMARAL, J. P. (2013). Calling behaviour under climate change: geographical and seasonal variation of calling temperatures in ectotherms. Global Change Biology 19, 2655–2674.

PENAR, W.; MAGIERA, A.; KLOCEK, C. (2020) Applications of bioacoustics in animal ecology. Ecological Complexity. 43, 100847, 1-5. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2020.100847

PRIYADARSHANI, N., MARSLAND, S. & CASTRO, I. (2018). Automated birdsong recognition in complex acoustic environments: a review. Journal of Avian Biology 49, jav-01447.

PUGLIANO, Sergio Ewerton. **Uso de gravadores autônomos para detecção de espécies de aves noturnas em paisagens fragmentadas de mata atlântica.** Trabalho de conclusão de curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2021. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/cb928d32-5cda-4d4c-baf2-42c8463ccdb8/content.

SCARPELLI, M. D. A., RIBEIRO, M. C., & TEIXEIRA, C. P. (2021). What does Atlantic Forest soundscapes can tell us about landscape? Ecological Indicators, 121.

SUGAI, L. S. M. & LLUSIA, D. (2019). Bioacoustic time capsules: using acoustic monitoring to document biodiversity. Ecological Indicators 99, 149–152.

SUGAI, L. S. M., SILVA, T. S. F., RIBEIRO, J. W. & LLUSIA, D. (2019). Terrestrial passive acoustic monitoring: review and perspectives. BioScience 69, 15–25.

SHEN, X. et al. (2026)Automated bird sound recognition in ecology: A methodological review and application framework.Avian Research. 17, 100368, 1-15. DOI: https://doi.org/10.1016/j.avrs.2026.100368

TUCKER, D., GAGE, S. H., WILLIAMSON, I. & FULLER, S. (2014). Linking ecological condition and the soundscape in fragmented Australian forests. Landscape Ecology 29, 745–758.

Anexos



Figura 1



Figura 2



Tabela 1



Tabela 2

CÓDIGO: SB0245

AUTOR: ANA BEATRIZ MAFALDO FERNANDES

ORIENTADOR: DENISE MORAIS LOPES GALENO

TÍTULO: O PAPEL DO EIXO INTESTINO-CÉREBRO NA INTERFACE ENTRE O SONO, A SAÚDE MENTAL E AS DOENÇAS CRÔNICAS

Resumo

O eixo intestino-cérebro tem papel central na integração entre processos fisiológicos, psicológicos e comportamentais. A comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal ocorre por vias neurais, endócrinas e imunológicas, tendo a microbiota intestinal como elemento central. Alterações nessa microbiota têm sido associadas a distúrbios de saúde mental, alterações do sono e a doenças crônicas não transmissíveis. No ambiente universitário, fatores como estresse acadêmico, alimentação inadequada e irregularidade do sono podem comprometer essa homeostase. Estudo observacional, transversal, com monitoramento prospectivo de 9 dias, envolvendo 8 indivíduos de ambos os sexos, com idade média de 24,0 ± 3,2 anos, vinculados à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). A coleta incluiu questionários validados — Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI-BR), Escala de Sintomas Gastrointestinais (GSRS), Escala de Depressão, Ansiedade e Estresse (DASS-21), Questionário de Cronotipo de Horne-Östberg e questionário alimentar do Ministério da Saúde —, actigrafia, diário do sono, registro alimentar prospectivo e Escala de Bristol. Os resultados parciais (n=8) demonstraram elevada frequência de má qualidade do sono (87,5%; PSQI médio de 8,0 ± 2,9), privação de sono (62,5% com Tempo Total de Sono < 7h), sintomas gastrointestinais em 62,5% e escores elevados de depressão (75,0%) e estresse (62,5%), sugerindo relevância do eixo intestino-cérebro.

Palavras-chave: sono; saúde mental; microbiota; eixo intestino-cérebro; actigrafia

TITLE: Gut-brain axis in the interface between sleep, mental health and chronic diseases

Abstract

The gut-brain axis plays a central role in integrating physiological, psychological and behavioral processes. Bidirectional communication between the central nervous system

and the gastrointestinal tract occurs through neural, endocrine and immunological pathways, with the intestinal microbiota as a central element. Alterations in this microbiota have been associated with mental health disorders, sleep disturbances and chronic noncommunicable diseases. In the university environment, academic stress, inadequate diet and irregular sleep may compromise this homeostasis. Observational, cross-sectional study with 9-day prospective monitoring, involving 8 individuals of both sexes, mean age 24.0 ± 3.2 years, affiliated with the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN). Data collection included validated questionnaires — Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-BR), Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS), Depression, Anxiety and Stress Scale (DASS-21), Horne-Östberg Chronotype Questionnaire and the Ministry of Health dietary questionnaire —, actigraphy, sleep diary, prospective dietary record and Bristol Stool Scale. Partial results (n=8) showed high rates of poor sleep quality (87.5%; mean PSQI 8.0 ± 2.9), sleep deprivation (62.5% with Total Sleep Time < 7h), gastrointestinal symptoms in 62.5% and elevated depression (75.0%) and stress (62.5%) scores, suggesting relevance of the gut-brain axis.

Keywords: sleep; mental health; microbiota; gut-brain axis; actigraphy

Introdução

A incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo diabetes mellitus tipo 2, obesidade e transtornos psicológicos, tem aumentado progressivamente nas últimas décadas, despertando crescente interesse no papel do eixo intestino-cérebro sobre a saúde física e mental (OMS, 2025). A disbiose intestinal — desequilíbrio ecológico da microbiota — tem sido associada a alterações na permeabilidade intestinal, modulação imunológica e vias neuroendócrinas, com possível participação na fisiopatologia de condições como diabetes, doenças autoimunes e transtornos psicológicos (SARKAR et al., 2016; ANDRADE, 2024). O sono desempenha papel fundamental na regulação neuroendócrina, metabólica e imunológica. Sua privação tem sido associada a sintomas gastrointestinais, prejuízo cognitivo, manifestações depressivas e ansiosas, além de maior risco de DCNT (FOSTER et al., 2013; WANG et al., 2023). Evidências sugerem ainda que alterações no sono podem modificar a composição da microbiota intestinal, sustentando uma relação bidirecional entre sono, inflamação e eixo intestino-cérebro (LI et al., 2018). No ambiente acadêmico, estudantes e profissionais universitários estão frequentemente expostos a estresse elevado, privação de sono e irregularidade alimentar — fatores que podem comprometer a homeostase do eixo intestino-cérebro e favorecer estados de disbiose (FOSTER et al., 2013; JIANG et al., 2015). Apesar do crescente interesse científico, há escassez de estudos nacionais que investiguem de forma integrada os aspectos gastrointestinais, psicológicos e de sono nessa população. Diante disso, o presente estudo busca investigar as associações entre qualidade da alimentação, sintomas gastrointestinais, eficiência do sono e indicadores de saúde mental, à luz do eixo intestino-cérebro, em indivíduos vinculados à UFRN.

Metodologia

Trata-se de um estudo observacional, analítico, de delineamento transversal com monitoramento prospectivo de 9 dias, que utiliza instrumento objetivo (actigrafia) e instrumentos subjetivos (questionários validados e diário estruturado) para avaliar associações entre variáveis fisiológicas, comportamentais e psicológicas em estudantes e profissionais universitários. O estudo é realizado no Laboratório de Fisiologia do Sono (LFS), Departamento de Fisiologia e Comportamento da UFRN. A população do estudo é composta por indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 18 e 65 anos, vinculados à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), incluindo estudantes, docentes e técnicos-administrativos. Trata-se de uma amostra não probabilística, obtida por conveniência, com previsão de inclusão de 30 participantes que atenderem aos critérios de inclusão e aceitarem participar voluntariamente da pesquisa durante o período de coleta de dados. O número amostral previsto considerou a viabilidade logística do protocolo de pesquisa, que envolve monitoramento actigráfico contínuo, aplicação de questionários e registros diários de sono e alimentação durante nove dias. Considerando o caráter exploratório do estudo, a estratégia de amostragem adotada é adequada para caracterização descritiva da amostra e para investigar as associações propostas entre qualidade da alimentação, sintomas gastrointestinais, parâmetros do sono, cronotipo e indicadores de saúde mental. Foram incluídos indivíduos com vínculo ativo à UFRN, disponibilidade para uso do actígrafo e preenchimento integral dos instrumentos, mediante assinatura do TCLE. Foram excluídos indivíduos com transtornos psiquiátricos graves recentes (≤6 meses), doenças agudas ou uso de antibióticos nos últimos 30 dias.

A coleta foi estruturada em cinco etapas: (1) aplicação de questionário sociodemográfico e clínico autorreferido; (2) entrega do actígrafo (ActTrust 2, Condor Instruments) e orientações; (3) uso do actígrafo no punho não dominante por 9 dias consecutivos, com preenchimento diário de diário do sono, registro alimentar prospectivo e Escala de Fezes de Bristol; (4) devolução do equipamento e preenchimento do formulário eletrônico com os instrumentos validados: Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh, versão brasileira (PSQI-BR; BERTOLAZI et al., 2011), Escala de Sintomas Gastrointestinais (GSRS; SOUZA et al., 2016), Escala de Depressão, Ansiedade e Estresse (DASS-21; VIGNOLA & TUCCI, 2014), questionário alimentar do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018) e Questionário de Cronotipo de Horne-Östberg (BENEDITO-SILVA et al., 1990); (5) processamento dos dados de actigrafia no software ActStudio v.2.2.5.007 (Condor Instruments), extraindo os parâmetros de sono Tempo Total de Sono (TST), eficiência, latência e Tempo Acordado Após o Início do Sono (WASO), além dos parâmetros de ritmo circadiano Estabilidade Interdiária (IS), Variabilidade Intradiária (IV), Amplitude Relativa (RA), período de 5 horas menos ativas (L5) e período de 10 horas mais ativas (M10). O registro alimentar foi classificado pelo sistema NOVA (MONTEIRO et al., 2018). As análises foram realizadas nos softwares Jamovi e SPSS, com estatística descritiva, correlação de Pearson ou Spearman, teste t de Student ou Mann-Whitney e regressão linear múltipla ($p<0,05$). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (Parecer nº 8.294.730; CAAE: 94571925.5.0000.5537), em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012.

Resultados e Discussões

NOTA: Resultados parciais e exploratórios, referentes ao subconjunto de 8 participantes com dados completos na etapa inicial da coleta (dados mais antigos, sem lacunas em nenhum instrumento). Estudo em andamento — coleta prevista até dezembro de 2026. Análises inferenciais serão realizadas com a amostra completa (n=30). As Tabelas 1 a 4 e as Figuras 1 a 4 citadas neste texto encontram-se no documento de Anexos.

1. Perfil descritivo da amostra

A amostra parcial foi composta por 8 participantes com dados válidos, sendo 6 do sexo feminino (75%) e 2 do sexo masculino (25%), com idade média de 24,0 ± 3,2 anos (variação de 20 a 29 anos) e IMC médio de 24,1 ± 3,7 kg/m², dentro da faixa eutrófica/limítrofe. Todos os participantes eram estudantes de medicina da UFRN. As características sociodemográficas e clínicas completas da amostra estão detalhadas na Tabela 1 (Anexo).

2. Aspectos clínicos, medicações e eixo intestino-cérebro

Entre os participantes em uso de medicação (n=5), os antidepressivos identificados foram exclusivamente Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN) e moduladores serotoninérgicos atípicos — bromidrato de vortioxetina (P01 e P04) e venlafaxina (P02), desvenlafaxina (P03, apresentação Deller®) —, prescritos para quadros psiquiátricos primários; nenhum participante utilizou antidepressivo tricíclico (ATC), classe frequentemente empregada em baixas doses para dor abdominal funcional e disbiose. Observou-se ainda uso de psicoestimulantes para Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) — lisdexanfetamina (P04, apresentação Venvanse®), metilfenidato e atomoxetina (P02) — e de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), incluindo ibuprofeno e cetorolaco (P03, apresentação Toragesic®). Fármacos com ação serotoninérgica/noradrenérgica, estimulantes e AINEs podem exercer efeitos indiretos sobre a motilidade gastrointestinal e a percepção de dor visceral, o que constitui um possível fator de confusão na interpretação da sintomatologia avaliada pelo GSRS nesses indivíduos (KEEFER; KO; FORD, 2021; ARFEEN et al., 2024). Nenhum participante referiu diagnóstico formal de Síndrome do Intestino Irritável (SII); entretanto, 62,5% (n=5 de 8) apresentaram escore médio do GSRS acima de 2, indicativo de sintomatologia gastrointestinal clinicamente relevante mesmo sem diagnóstico prévio. A distribuição dos sintomas por domínio do GSRS — com indigestão e constipação como os domínios mais afetados — está detalhada na Tabela 3 (Anexo). A distribuição individual dos escores de PSQI-BR, DASS-21 e GSRS por participante é ilustrada na Figura 2 (Anexo).

3. Qualidade subjetiva do sono (PSQI-BR)

Avaliada pelo Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI-BR), 87,5% da amostra (n=7 de 8) foi classificada como portadora de má qualidade de sono (escore > 5, ponto de corte de BERTOLAZI et al., 2011), com escore médio de 8,0 ± 2,9 pontos — reforçando que a percepção subjetiva de sono ruim é praticamente universal nessa população, mesmo entre os que dormem próximo ao recomendado em termos objetivos.

4. Saúde mental (DASS-21)

Quanto à saúde mental, avaliada pela Escala de Depressão, Ansiedade e Estresse (DASS-21, escores brutos por domínio; VIGNOLA & TUCCI, 2014), observou-se que 75,0% (n=6/8) apresentaram escores de depressão acima do nível normal (corte > 9; média: 14,0 ± 8,1); 37,5% (n=3/8) apresentaram escores de ansiedade acima do normal (corte > 7; média: 8,0 ± 6,0); e 62,5% (n=5/8) apresentaram escores de estresse acima do nível normal (corte > 14; média: 19,0 ± 9,8).

5. Cronotipo e qualidade da alimentação

Em relação ao cronotipo, avaliado pelo Questionário de Horne-Östberg, a maioria dos participantes foi classificada como intermediária (62,5%; n=5), seguida das classificações vespertina (25,0%; n=2) e matutina (12,5%; n=1), com pontuação média de 45,8 ± 13,1 pontos. A qualidade da alimentação foi avaliada pelo sistema NOVA — calculado pela diferença entre a proporção de alimentos ultraprocessados e a de alimentos in natura, de modo que escores negativos indicam predomínio de alimentos in natura —, com predomínio de alimentos in natura em 75,0% (n=6/8) dos participantes (escore médio: -0,165 ± 0,155; n=8). Pelo instrumento do Ministério da Saúde, o escore médio foi de 36,9 ± 10,1 pontos: 25,0% (n=2/8) obtiveram classificação de alimentação saudável (> 41 pontos), 37,5% (n=3/8) apresentaram perfil intermediário (32–41 pontos) e 37,5% (n=3/8) obtiveram pontuação indicativa de necessidade de mudanças (≤ 31 pontos). Quanto ao trânsito intestinal, a Escala de Bristol apresentou consistência fecal média de 2,94 ± 1,15 (n=8), compatível com tendência a fezes formadas (tipo 2–3), variando de aspecto mais endurecido e fragmentado (tipo 2) a fezes formadas com fissuras superficiais (tipo 3). A distribuição do cronotipo e do score NOVA por participante é ilustrada na Figura 3 (Anexo).

6. Parâmetros de actigrafia (padrão de sono-vigília)

Os dados objetivos obtidos por meio da actigrafia revelaram um perfil de restrição e fragmentação do sono na população estudada. Os resultados das variáveis contínuas estão detalhados na Tabela 2 (Anexo), expressos em média e desvio-padrão. A representação gráfica individual desses parâmetros está na Figura 1 (Anexo).

Tempo Total de Sono (TST): os estudantes apresentaram Tempo Total de Sono médio de 6h 32min ± 1h 31min (6,53 ± 1,52 horas) por noite. Cinco dos 8 participantes (62,5%) apresentaram TST inferior ao limite mínimo recomendado de 7 horas diárias para adultos jovens (AASM, 2018; WATSON et al., 2015), variando de 4h 21min a 8h 59min, o que evidencia frequência elevada de restrição de sono na amostra.

Latência do sono: o tempo para início do sono foi de 5,62 ± 4,29 minutos, dentro dos parâmetros de normalidade descritos na literatura para adultos jovens saudáveis (habitualmente inferiores a 15–20 minutos; OHAYON et al., 2017; LICHSTEIN et al., 2003), com variabilidade individual considerável (1,38–13,60 min).

Eficiência do sono: a eficiência média foi de 86,65 ± 5,37%, discretamente acima do valor de referência de 85% frequentemente adotado como limiar de boa eficiência. Esse ponto de corte deve ser interpretado com cautela, uma vez que não constitui um valor de normalidade universal para dados de actigrafia (LICHSTEIN et al., 2003; OHAYON et al., 2017). Ainda assim, 2 dos 8 participantes (25%) ficaram abaixo desse referencial (76,76% e 80,60%), valores que coincidem com os dois maiores tempos de WASO da

amostra — sugerindo que, nesses casos específicos, a fragmentação do sono (despertares e vigília intra-sono), mais do que o tempo total dormido, é o principal fator que reduz a eficiência.

WASO e despertares: o tempo acordado após o início do sono (WASO) foi de 36,56 ± 26,86 minutos (n=7), próximo ao limiar superior de referência para jovens saudáveis (30–45 min; OHAYON et al., 2017; LICHSTEIN et al., 2003; FEKEDULEGN et al., 2020), com número médio de 12,16 ± 12,10 despertares por noite (n=7), sugerindo fragmentação relevante em parte dos participantes.

Parâmetros circadianos: os índices não paramétricos de ritmo circadiano (VAN SOMEREN et al., 1999) revelaram o seguinte perfil — a Variabilidade Intradiária (IV = 0,86 ± 0,16), situada acima do limiar de 0,80 em uma escala de 0 a 2 (onde valores mais altos indicam maior fragmentação do ritmo ao longo do dia/noite), aponta elevada fragmentação do ritmo descanso-atividade ao longo das 24 horas. A Estabilidade Interdiária (IS = 0,40 ± 0,10; n=7), que varia de 0 — ausência de ritmo — a 1 — forte acoplamento ao ciclo de 24h —, indica baixa a moderada sincronização diária entre os dias analisados, compatível com a irregularidade de rotinas universitárias. A Amplitude Relativa (RA = 0,83 ± 0,11) reflete contraste moderado a elevado entre os períodos de maior e menor atividade. Todos os parâmetros de actigrafia, com mínimos, máximos e notas sobre exclusões pontuais de dados, estão detalhados na Tabela 2 (Anexo).

7. Síntese dos instrumentos aplicados

A Tabela 4 (Anexo) reúne, de forma consolidada, os resultados de todos os instrumentos validados aplicados à amostra (PSQI-BR, GSRS, DASS-21, Cronotipo, Score NOVA, Questionário MS e Escala de Bristol), com médias, desvios-padrão e classificações predominantes, para referência rápida.

8. Tendências exploratórias

A inspeção de gráficos de dispersão com linha de tendência e cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r) — ver Figura 4 (Anexo) — sugere associações de intensidade variável entre as variáveis investigadas nesta amostra reduzida (n=8). Entre Tempo Total de Sono e escore do PSQI observou-se r = 0,41 — associação fraca e positiva, no sentido oposto ao inicialmente hipotetizado, sugerindo que dormir mais não necessariamente correspondeu, nesta amostra parcial, a melhor percepção subjetiva da qualidade do sono. Entre o escore do GSRS e o escore de depressão do DASS-21 observou-se r = -0,27 — uma associação fraca e negativa, sugerindo que, nesta amostra, maior sintomatologia gastrointestinal não se traduziu em maior escore depressivo. Entre a qualidade da alimentação (score NOVA) e o escore do GSRS observou-se r = -0,36, sugerindo, no sentido esperado pela literatura, que uma alimentação mais próxima do padrão in natura acompanhou escores gastrointestinais discretamente menores. Entre a eficiência do sono e o escore de estresse do DASS-21 observou-se r = -0,49 — a associação mais forte entre as testadas, indicando que menor eficiência do sono acompanhou maiores escores de estresse. Todas as observações têm caráter exploratório, dado o tamanho amostral reduzido (n=8); nenhuma inferência causal é permitida com os dados atuais, e a leitura mais honesta é a de tendências a testar formalmente na amostra completa (n=30).

Conclusão

O presente relatório apresenta os resultados parciais e preliminares do estudo sobre o papel do eixo intestino-cérebro na interface entre sono, saúde mental e doenças crônicas, conduzido no Laboratório de Fisiologia do Sono da UFRN, com coleta de dados ainda em andamento. Os achados referentes à amostra inicial de 8 participantes indicam prevalência expressiva de privação de sono objetiva (TST < 7h em 62,5%), má qualidade subjetiva do sono (87,5% com PSQI > 5), sintomas gastrointestinais clinicamente relevantes (62,5%) e escores elevados de depressão (75,0%) e estresse (62,5%) em uma população jovem universitária, reforçando a hipótese central de que o ambiente universitário constitui contexto de vulnerabilidade para desequilíbrios nos sistemas de sono, saúde mental e função gastrointestinal, possivelmente mediados pelo eixo intestino-cérebro; ainda assim, o tamanho amostral atual não permite análises inferenciais com poder estatístico adequado, e as tendências exploratórias observadas serão testadas formalmente à medida que a coleta avançar para a amostra completa (n=30), com inclusão de participantes de diferentes vínculos institucionais para ampliar a representatividade dos achados.

Referências

ANDRADE, M. E. G. A microbiota intestinal, doenças associadas e os possíveis tratamentos: uma revisão narrativa. Revista Brasileira de Saúde e Desenvolvimento Humano, v. 12, n. 2, p. 1-13, 2024.

ARFEEN, M.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, N.; KHAN, R. A.; ALMAHMOUD, S. A.; MOHAMMED, H. A. Design, classification, and adverse effects of NSAIDs: a review on recent advancements. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 112, p. 117899, 2024.

BENEDITO-SILVA, A. A. et al. Self-assessment questionnaire for the determination of morningness-eveningness types in Brazil. Progress in Clinical and Biological Research, v. 341, p. 89-98, 1990.

BERTOLAZI, A. N. et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. Sleep Medicine, v. 12, n. 1, p. 70-75, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Como está a sua alimentação? Brasília, 2018.

FEKEDULEGN, D.; ANDREW, M. E.; SHI, M.; VIOLANTI, J. M.; KNOX, S.; INNES, K. E. Actigraphy-based assessment of sleep parameters. Annals of Work Exposures and Health, v. 64, n. 4, p. 350-367, 2020.

FOSTER, J. A.; MCVEY NEUFELD, K. A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. Trends in Neurosciences, v. 36, n. 5, p. 305-312, 2013.

JIANG, H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. Brain, Behavior and Immunity, v. 48, p. 186-194, 2015.

KEEFER, L.; KO, C. W.; FORD, A. C. AGA Clinical Practice Update on Management of Chronic Gastrointestinal Pain in Disorders of Gut-Brain Interaction: Expert Review. Clinical Gastroenterology and Hepatology, v. 19, n. 12, p. 2481-2488.e1, 2021.

LI, Y. et al. The role of microbiome in insomnia, circadian disturbance and depression. Frontiers in Psychiatry, v. 9, p. 669, 2018.

LICHSTEIN, K. L.; DURRENCE, H. H.; TAYLOR, D. J.; BUSH, A. J.; RIEDEL, B. W. Quantitative criteria for insomnia. Behaviour Research and Therapy, v. 41, n. 4, p. 427-445, 2003.

MONTEIRO, C. A. et al. The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification. Public Health Nutrition, 2018.

OHAYON, M.; WICKWIRE, E. M.; HIRSHKOWITZ, M. et al. National Sleep Foundation's sleep quality recommendations: first report. Sleep Health, v. 3, n. 1, p. 6-19, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Sleep and health. Genebra: WHO, 2025.

SARKAR, A. et al. Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. Trends in Neurosciences, v. 39, n. 11, p. 763-781, 2016.

SOUZA, G. S. et al. Translation and validation of the GSRS to Brazilian Portuguese. Arquivos de Gastroenterologia, v. 53, n. 3, p. 146-151, 2016.

VAN SOMEREN, E. J. W.; SWAAB, D. F.; COLENDA, C. C. et al. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. Chronobiology International, v. 16, n. 4, p. 505-518, 1999.

VIGNOLA, R. C.; TUCCI, A. M. Adaptation and validation of the DASS to Brazilian Portuguese. Journal of Affective Disorders, v. 155, p. 104-109, 2014.

WANG, X. et al. Gut microbiota-derived metabolites mediate neuroprotection in sleep deprivation. Microbiome, v. 11, p. 17, 2023.

WATSON, N. F. et al. Recommended amount of sleep for a healthy adult: a joint consensus statement of the American Academy of Sleep Medicine and Sleep Research Society. Sleep, v. 38, n. 6, p. 843-844, 2015.

Anexos



Anexo 1



Anexo 2



Anexo 3



Anexo 4



Anexo 5



Anexo 6

CÓDIGO: SB0253

AUTOR: LUIZA MACEDO DELGADO

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Efeitos da Yoga como Terapia Complementar ao Tratamento Farmacológico na Depressão Maior: Avaliação da Resposta Antidepressiva e do Risco de Suicídio em Universitários

Resumo

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma das principais causas de incapacidade no mundo, com elevada prevalência entre universitários. O presente estudo avaliou os efeitos de um protocolo remoto de Yoga multimodal associado ao escitalopram sobre a resposta antidepressiva em universitários com TDM, correspondente à Etapa 1 do plano de trabalho. Em um ensaio clínico randomizado, aberto e de 12 semanas, 66 voluntários foram alocados em dois grupos: escitalopram exclusivo (ESC; $n = 33$) e escitalopram associado a Yoga (EYA; $n = 33$). Os sintomas depressivos foram avaliados nas semanas 0, 5 e 12 pela escala clínica MADRS e pelo autorrelato BDI-II, analisados por Modelos Lineares Generalizados Mistos (GzLMM). Ambos os grupos apresentaram redução significativa dos sintomas na MADRS ao longo do tempo ($p < 0{,}001$), sem diferenças estatísticas entre si ($p > 0{,}05$). As taxas de resposta clínica (59% ESC vs. 52% EYA) e remissão (52% ESC vs. 57% EYA) foram comparáveis, com discreta vantagem numérica de remissão para o grupo Yoga. No BDI-II, o grupo EYA manteve melhora contínua até a 12ª semana ($p < 0{,}001$), enquanto o grupo ESC estabilizou entre as semanas 5 e 12 ($p = 0{,}202$), culminando em menor proporção de sintomas graves residuais no EYA (8% vs. 24%). Conclui-se que o Yoga multimodal atua como terapia complementar viável e segura, favorecendo a remissão clínica e a melhora subjetiva contínua no TDM.

Palavras-chave: Depressão; Yoga; Escitalopram; Universitários.

TITLE: Effects of Yoga as a Complementary Therapy to Pharmacological Treatment for Major Depression: Evaluation of Antidepressant Response and Suicide Risk in University Students

Abstract

Major Depressive Disorder (MDD) is a leading cause of disability worldwide, with high prevalence among university students. This study evaluated the effects of a remote multimodal Yoga protocol combined with escitalopram on antidepressant response in

university students with MDD, corresponding to Step 1 of the research work plan. In a 12-week open-label randomized controlled trial, 66 volunteers were allocated into two groups: escitalopram monotherapy (ESC; n=33) and escitalopram combined with Yoga (EYA; n=33). Depressive symptoms were assessed at weeks 0, 5, and 12 using the clinician-rated MADRS scale and self-reported BDI-II inventory, analyzed via Generalized Linear Mixed Models (GzLMM). Both groups showed significant symptom reduction on the MADRS over time ($p<0.001$), with no statistically significant differences between groups ($p>0.05$). Clinical response (59% ESC vs. 52% EYA) and remission rates (52% ESC vs. 57% EYA) were comparable, with a slight numerical advantage in remission for the Yoga group. On the BDI-II, the EYA group maintainedcontinuous improvement up to week 12 ($p<0.001$), whereas the ESC group plateaued between weeks 5 and 12 ($p=0.202$), resulting in a lower proportion of residual severe symptoms in EYA (8% vs. 24%). In conclusion, multimodal Yoga is a feasible and safe complementary therapy, favoring clinical remission and continuous subjective improvement in MDD.

Keywords: Depression; Yoga; Escitalopram; University students.

Introdução

3. INTRODUÇÃO O transtorno depressivo maior (TDM) é uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo e representa um importante problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência e ao impacto sobre a qualidade de vida, funcionalidade e produtividade dos indivíduos acometidos. Caracteriza-se por humor deprimido persistente e/ou perda de interesse ou prazer nas atividades habituais, frequentemente acompanhados por alterações do sono e do apetite, fadiga, prejuízos cognitivos, sentimentos de culpa ou inutilidade e ideação suicida. Estima-se que cerca de 4% da população mundial seja afetada pela doença, cuja prevalência tem aumentado progressivamente nas últimas décadas (Hidaka, 2012; World Health Organization, 2017). No contexto universitário, a depressão merece atenção especial devido à crescente frequência de sintomas depressivos entre estudantes de graduação e pós-graduação, população exposta a elevados níveis de estresse acadêmico e vulnerabilidade emocional. Estudos realizados em diferentes países demonstram aumento da prevalência de depressão entre universitários, evidenciando a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e acessíveis para esse grupo (Eisenberg et al., 2007; Blanco et al., 2014; Gewin, 2012). Além disso, o TDM está fortemente associado ao risco de suicídio, sendo um dos principais fatores relacionados à ideação, planejamento e tentativa de suicídio, especialmente em adultos jovens (Malone et al., 2000). O tratamento da depressão baseia-se principalmente no uso de antidepressivos. Embora esses medicamentos representem um avanço importante no manejo da doença, ainda apresentam limitações relevantes, incluindo início tardio da resposta terapêutica, efeitos adversos como ganho de peso e disfunção sexual, além de taxas insatisfatórias de resposta e remissão em parcela significativa dos pacientes (Cipriani et al., 2018; Hengartner & Plöderl, 2018). Dessa forma, cresce o interesse por intervenções complementares capazes de potencializar os efeitos da farmacoterapia e contribuir para um cuidado mais abrangente. Entre essas estratégias, destacam-se as práticas mente-corpo, especialmente a yoga, que integra exercícios respiratórios, posturas corporais e técnicas meditativas com efeitos sobre a regulação emocional, o equilíbrio autonômico e a resposta ao estresse. Evidências sugerem que a prática regular de yoga reduz sintomas depressivos e

melhora aspectos físicos e psicológicos relacionados ao transtorno, possivelmente por modular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e favorecer mecanismos de autorregulação emocional (Brown & Gerbarg, 2005; Bennett et al., 2008; Naveen et al., 2016). Além disso, protocolos domiciliares (home-based) representam uma alternativa promissora por ampliarem o acesso à intervenção e favorecerem a adesão ao tratamento, especialmente em populações com limitações de tempo ou deslocamento (Uebelacker et al., 2017). Apesar dos resultados promissores, ainda são limitadas as evidências sobre a utilização da yoga como terapia complementar ao tratamento farmacológico da depressão maior, particularmente em relação à sua influência sobre a resposta antidepressiva, especialmente em intervenções realizadas com a população universitária. Nesse contexto, o presente estudo — correspondente à primeira etapa do plano de trabalho — tem como objetivo avaliar e comparar os efeitos de um protocolo multimodal de yoga associado ao escitalopram sobre a resposta antidepressiva em universitários com depressão maior, em comparação ao tratamento farmacológico exclusivo. A análise dos desfechos relativos ao risco e ideação suicida, bem como marcadores biológicos do ensaio clínico, constituirá o escopo de planos de trabalho subsequentes.

Metodologia

4. METODOLOGIA 4.1 Participantes e recrutamento O presente estudo integra um ensaio clínico randomizado, controlado e aberto, desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal/RN. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (CAAE: 40046320.9.0000.5537) e registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC). Participaram do estudo estudantes e servidores da UFRN, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos e diagnóstico de transtorno depressivo maior (TDM). O recrutamento foi realizado por meio de divulgação em mídias sociais, boletins eletrônicos da universidade, fóruns dos cursos no SIGAA, cartazes e pelo aplicativo do Programa de Enfrentamento à Tristeza. Todos os participantes receberam informações sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes do início das avaliações. 4.2 Critérios de inclusão e exclusão Foram incluídos indivíduos com episódio depressivo maior atual, idade entre 18 e 60 anos, vínculo com a UFRN e disponibilidade de acesso à internet e smartphone para acompanhamento remoto. Inicialmente, os voluntários foram submetidos a uma triagem por meio do Patient Health Questionnaire-2 (PHQ-2). Aqueles que atingiram a pontuação de corte foram encaminhados para consulta psiquiátrica on-line, na qual o diagnóstico foi confirmado utilizando a Mini Entrevista Neuropsiquiátrica Internacional (MINI) e a Escala de Avaliação para Depressão de Montgomery-Åsberg (MADRS). Foram excluídos participantes com outros transtornos psiquiátricos, uso de medicamentos psiquiátricos ou neurológicos incompatíveis com o protocolo (exceto antidepressivos), prática regular de yoga fora da pesquisa, gestação ou lactação, fobia de sangue ou injeções e limitações físicas ou cognitivas que impedissem a realização da intervenção proposta. 4.3 Desenho experimental Após a inclusão no estudo, os participantes foram randomizados em dois grupos terapêuticos: grupo tratado exclusivamente com escitalopram (ESC; n = 33) e grupo tratado com escitalopram associado à prática de Yoga Ásanas (EYA; n = 33). A intervenção teve duração de 12 semanas. O tratamento farmacológico foi conduzido pela equipe médica da Unidade de Atenção Psicossocial do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), responsável pela prescrição e pelos ajustes de dose do

escitalopram conforme a evolução clínica dos participantes. O grupo EYA participou de um protocolo estruturado de Yoga Ásanas realizado em formato remoto, composto por aulas síncronas e assíncronas conduzidas por profissional habilitado. As sessões incluíram posturas corporais, exercícios respiratórios e técnicas de relaxamento, buscando complementar o tratamento medicamentoso e favorecer a adesão dos participantes. As avaliações foram realizadas nas semanas 0, 5 e 12 de tratamento. A gravidade dos sintomas depressivos foi avaliada pela MADRS, aplicada por psiquiatra treinado, sendo considerada resposta terapêutica uma redução igual ou superior a 50% da pontuação inicial e remissão um escore final ≤12. Como medida complementar da intensidade dos sintomas depressivos, também foi utilizado o Inventário de Depressão de Beck (BDI-II). Além desses instrumentos, foram aplicados outros questionários clínicos previstos no protocolo do ensaio para caracterização dos participantes e acompanhamento da intervenção, incluindo instrumentos para avaliação da ideação suicida. Entretanto, embora esses dados tenham sido coletados durante o estudo, sua análise não integrou o escopo do presente plano de trabalho, sendo prevista para etapa posterior do projeto. Dessa forma, este relatório concentra-se exclusivamente na avaliação da resposta antidepressiva dos participantes submetidos às intervenções propostas. 4.4 Análise de resultados Os dados foram organizados em banco de dados eletrônico e analisados por meio do software SPSS (versão 29), adotando-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A análise foi conduzida segundo o princípio da intenção de tratar (intention-to-treat), mantendo na análise todos os participantes inicialmente randomizados, inclusive aqueles que interromperam o acompanhamento. Os efeitos das intervenções sobre os sintomas depressivos (MADRS e BDI-II) foram avaliados por meio de Modelos Lineares Generalizados Mistos (GzLMM) com covariâncias robustas, utilizando distribuição normal e função de ligação identidade. No modelo, a combinação dos fatores grupo de tratamento (ESC e EYA) e tempo de avaliação (S0, S5 e S12) foi inserida como efeito fixo, e os participantes como efeito aleatório, sendo o efeito conjunto de grupo e tempo avaliado pelo teste omnibus dos efeitos fixos (F com 5 graus de liberdade no numerador correspondentes às combinações fatoriais de 2 grupos × 3 momentos − 1). Sexo, dose de escitalopram e duração da depressão foram incluídos como covariáveis. Diferenças entre os grupos e entre os momentos de avaliação foram investigadas por contrastes pareados com correção de Fisher para comparações múltiplas. Embora o protocolo do ensaio clínico contemplasse a avaliação de outros desfechos, como ideação suicida, ansiedade, qualidade do sono e biomarcadores, essas variáveis não constituíram objeto de análise do presente plano de trabalho, sendo abordadas em etapas posteriores do projeto.

Resultados e Discussões

5. RESULTADOS 5.1 Características da amostra Participaram do estudo 66 universitários diagnosticados com TDM, divididos entre o grupo escitalopram exclusivo (ESC; $n = 33$) e escitalopram associado a Yoga (EYA; $n = 33$). Os grupos foram homogêneos no momento basal quanto ao sexo feminino (72,7% em ambos; $p = 1,000$), idade (25,9 ± 5,3 anos no ESC vs. 28,2 ± 9,5 anos no EYA; $p = 0,251$), renda e gravidade inicial dos sintomas depressivos na MADRS (27,8±5,6 vs. 25,1±6,3; $p = 0,070$) e no BDI-II (30,7 ± 8,5 vs. 28,7 ± 5,7; $p = 0,337$). Ao longo das 12 semanas, 6 participantes do grupo ESC e 9 do grupo EYA descontinuaram o estudo, resultando em 27 e 24 concluintes, respectivamente. 5.2 Evolução dos sintomas depressivos A

avaliação clínica heteroaplicada por meio da escala MADRS demonstrou redução acentuada e progressiva da sintomatologia depressiva em ambos os grupos. O modelo GzLMM revelou um efeito estatisticamente significativo conjunto de grupo e tempo (F = 82,95; p < 0,001), evidenciando a eficácia geral das abordagens ao longo das 12 semanas. No grupo tratado exclusivamente com escitalopram (ESC), a média marginal estimada da MADRS — ajustada pelas covariáveis do modelo — reduziu de 33,43 ± 1,10 no basal para 15,05 ± 1,18 na 5ª semana e atingiu 8,13 ± 1,46 ao término do estudo. No grupo sob intervenção combinada com Yoga (EYA), o escore estimado reduziu de 31,94 ±1,62 no basal para 14,98±1,27 na 5ª semana, finalizando com 11,14 ± 1,55 na 12ª semana. As análises comparativas intergrupos revelaram que as trajetórias de melhora clínica foram estatisticamente equivalentes, não sendo observadas diferenças significativas entre as intervenções no basal (p = 0,349), na 5ª semana (p = 0,967) ou ao final do tratamento (p = 0,119). Na avaliação por autorrelato por meio do inventário BDI-II, também se observou efeito conjunto significativo (F = 36,22; p < 0,001). No entanto, o padrão de evolução temporal diferiu entre os grupos. No grupo Yoga (EYA), observou-se melhora contínua e linear em todas as etapas de avaliação (p < 0,001), com a média ajustada passando de 32,38 ± 1,26 no basal para 16,02 ±1,62 na 5ª semana e alcançando 11,36 ±1,79 na 12ª semana. Em contraste, o grupo sob farmacoterapia exclusiva (ESC) apresentou um padrão de platô na segunda metade do acompanhamento: embora tenha ocorrido redução significativa entre o basal (35,51 ± 1,60) e a 5ª semana (17,00 ± 1,51; p < 0,001), os escores estabilizaram-se a partir de então, sem diferença significativa entre a 5ª e a 12ª semana (14,28±2,72; p = 0,202). As comparações diretas intergrupos no BDI-II não atingiram significância estatística no basal (p =0,066), na 5ª semana (p = 0,655) ou na 12ª semana (p = 0,333). 5.3 Taxas de resposta, remissão e gravidade residual Para a determinação dos desfechos clínicos ao término das 12 semanas, foram avaliados os participantes concluintes com escore final preenchido (n = 27 no grupo ESC e n = 23 no grupo EYA). As taxas de resposta clínica (redução ≥ 50% na escala MADRS em relação ao basal) foram de 59% (n = 16) no grupo ESC e 52% (n = 12) no grupo Yoga. A taxa de remissão clínica (escore final na MADRS ≤ 12) apresentou discreta vantagem numérica para o grupo sob intervenção complementar, situando-se em 57% (n = 13) no grupo EYA em comparação a 52% (n = 14) no grupo ESC. A autopercepção dos sintomas ao término do tratamento revelou diferenças importantes na gravidade residual. No grupo submetido à farmacoterapia exclusiva (ESC), 24% (n = 7) dos universitários ainda se percebiam em estado de depressão grave ao final das 12 semanas. Em contrapartida, no grupo que praticou Yoga complementar (EYA), essa proporção foi de apenas 8% (n = 2). A maioria dos praticantes de Yoga situou-se nas faixas de sintomatologia residual mínima (50%, n = 12) ou leve (25%, n = 6), demonstrando atenuação importante no sofrimento subjetivo percebido. 6. DISCUSSÃO Os resultados obtidos neste estudo demonstraram redução progressiva e clinicamente relevante dos sintomas depressivos ao longo das 12 semanas de tratamento, tanto na avaliação clínica realizada pela MADRS quanto na avaliação por autorrelato por meio do BDI-II. Essa melhora geral robusta é consistente com a literatura científica consolidada, que estabelece o escitalopram como um tratamento padrão-ouro seguro e eficaz para quadros depressivos agudos (Cipriani et al., 2018), bem como valida o potencial terapêutico do Yoga como uma prática integrativa viável para modular sintomas de humor (Cramer et al., 2013; Cramer et al., 2017; Moosburner et al., 2024). O achado mais instigante deste trabalho refere-se à discrepância de comportamento entre o desfecho medido clinicamente (MADRS) e o autopercebido pelo paciente (BDI-II). Enquanto o grupo submetido exclusivamente ao escitalopram

apresentou uma rápida melhora inicial seguida por um platô estatístico no BDI-II entre a 5ª e a 12ª semanas (p = 0,202), o grupo combinado com Yoga manteve melhora contínua e significativa ao longo de todo o período experimental (p < 0,001). Na farmacologia convencional da depressão, o fenômeno de estabilização do efeito terapêutico após as primeiras semanas de administração da droga é amplamente descrito e esperado, com a maior parte do ganho sintomático ocorrendo na fase de indução aguda (Cipriani et al., 2018; Hengartner & Plöderl, 2018). A manutenção da melhora progressiva observada apenas no grupo combinado sugere que a prática regular de Yoga atua de forma adjunta e incremental, alterando qualitativamente a percepção de bem-estar e reduzindo a carga de sofrimento subjetivo do paciente. Isso explica por que, na semana 12, a taxa de sofrimento residual grave percebido foi significativamente menor entre os praticantes de Yoga (8%) do que no grupo farmacológico exclusivo (24%), evidenciando que o Yoga pode otimizar a resposta ao tratamento padrão (Moosburner et al., 2024). Este estudo apresenta limitações metodológicas importantes que devem ser consideradas. O desenho experimental aberto (open-label), sem mascaramento dos avaliadores clínicos, representa uma fonte potencial de viés de expectativa na aplicação da escala heterorreferida MADRS por parte do psiquiatra, embora a inclusão de um instrumento de autorrelato (BDI-II) auxilie na mitigação dessa interferência. Adicionalmente, o tamanho amostral reduzido (n = 51 concluintes) limitou o poder estatístico do estudo para detectar diferenças de menor magnitude entre os tratamentos, e o período de acompanhamento de 12 semanas restringe conclusões sobre a durabilidade dos efeitos a longo prazo, reforçando a importância de futuras análises de follow-up. Por fim, cabe destacar que, em conformidade com o plano de trabalho estabelecido para a Etapa 1, os desfechos secundários relativos à ideação suicida, ansiedade, qualidade do sono e biomarcadores moleculares (cortisol, PCR e BDNF) não constituíram o escopo analítico deste relatório. A análise dessas variáveis adicionais e a exploração de suas correlações clínicas serão desenvolvidas em etapas subsequentes do projeto de pesquisa, sendo fundamentais para elucidar de forma integrada os caminhos biológicos e funcionais pelos quais o Yoga atua como uma estratégia complementar no Transtorno Depressivo Maior.

Conclusão

7. CONCLUSÕES O presente estudo buscou avaliar o potencial terapêutico adjuvante de um protocolo remoto de Yoga multimodal associado ao tratamento farmacológico com escitalopram, em comparação à farmacoterapia exclusiva, em universitários com Transtorno Depressivo Maior ao longo de 12 semanas. Os achados demonstraram que ambas as intervenções promoveram reduções acentuadas e clinicamente relevantes na sintomatologia depressiva. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre as trajetórias médias gerais dos grupos nas escalas MADRS e BDI-II, a intervenção combinada apresentou uma taxa de remissão clínica numericamente superior (57% no grupo Yoga contra 52% no grupo de farmacoterapia exclusiva), além de uma redução contínua e linear dos sintomas percebidos pelo próprio paciente, sem o efeito de estabilização precoce (platô) observado no grupo controle farmacológico. Esses achados são consistentes com evidências prévias da literatura que posicionam o Yoga como uma prática integrativa segura, viável e clinicamente eficaz na atenuação do sofrimento psíquico decorrente de episódios depressivos (Cramer et al., 2013; Cramer et al., 2017; Moosburner et al., 2024). Contudo, a generalização dos resultados deste relatório deve ser interpretada com cautela devido a limitações

metodológicas inerentes ao desenho do estudo, que incluem o delineamento aberto (ausência de mascaramento dos avaliadores na aplicação da MADRS), o tamanho amostral relativamente reduzido (n = 51 concluintes) e o tempo de acompanhamento limitado a 12 semanas para a avaliação da sustentação dos efeitos terapêuticos. Por fim, ressalta-se que este relatório conclui com êxito o plano de trabalho correspondente à Etapa 1 do projeto de pesquisa, centrada na análise da eficácia antidepressiva primária. Embora o protocolo amplo do ensaio clínico tenha contemplado a coleta de outras variáveis clínicas e biológicas — como ansiedade, qualidade do sono, flutuações de ideação suicida e dosagem de biomarcadores periféricos (cortisol, PCR e BDNF) —, a análise desses dados adicionais não integrou o escopo deste relatório de iniciação científica, sendo prevista para etapas e planos de trabalho subsequentes do grupo de pesquisa.

Referências

8. REFERÊNCIAS 1. Bennett, S., Weintraub, R., & Khalsa, S. B. (2008). Yoga for depression: A systematic review. International Journal of Yoga Therapy, 18(1), 89–96. 2. Blanco, C., Okuda, M., Wright, C., Hasin, D. S., Grant, B. F., Liu, S. M., & Olfson, M. (2014). Mental health of college students and their non-college-attending peers: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Archives of General Psychiatry, 65(12), 1429–1437. https://doi.org/10.1001/archpsyc.65.12.1429 3. Brown, R. P., & Gerbarg, P. L. (2005). Sudarshan Kriya yogic breathing in the treatment of stress, anxiety, and depression: Part I—neurophysiologic model. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 11(1), 189–201. https://doi.org/10.1089/acm.2005.11.189 4. Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Chaimani, A., Atkinson, L. Z., Ogawa, Y., ... & Geddes, J. R. (2018). Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: A systematic review and network meta-analysis. The Lancet, 391(10128), 1357–1366. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32802-7 5. Cramer, H., Anheyer, D., Lauche, R., & Dobos, G. (2017). A systematic review of yoga for major depressive disorder. Journal of Affective Disorders, 213, 70–77. https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.02.006 6. Cramer, H., Lauche, R., Langhorst, J., & Dobos, G. (2013). Yoga for depression: A systematic review and meta-analysis. Depression and Anxiety, 30(11), 1068–1083. https://doi.org/10.1002/da.22166 7. Eisenberg, D., Golberstein, E., & Hunt, J. B. (2007). Mental health service utilization among college students in the United States. The Journal of Nervous and Mental Disease, 195(7), 555–562. https://doi.org/10.1097/NMD.0b013e318030773c 8. Gewin, V. (2012). Mental health: Under pressure. Nature, 490(7420), 439–440. https://doi.org/10.1038/nj7420-439a 9. Hengartner, M. P., & Plöderl, M. (2018). False assumptions about the efficacy of antidepressants? Frontiers in Psychiatry, 9, 269. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00269 10. Hidaka, B. H. (2012). Depression as a disease of modernity: Explanations for increasing prevalence. Journal of Affective Disorders, 140(3), 205–214. https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.12.036 11. Malone, K. M., Haas, G. L., Sweeney, J. A., & Mann, J. J. (2000). Major depression and the risk of attempted suicide. Journal of Affective Disorders, 59(2), 183–190. https://doi.org/10.1016/S0165-0327(99)00127-5 12. Moosburner, A., et al. (2024). Yoga for depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience. https://doi.org/10.1007/s00406-024-01785-z 13. Naveen, G. H., Thirthalli, J., Rao, M. G., Vishal Bharadwaj, B., &

Gangadhar, B. N. (2016). Serum cortisol and BDNF in patients with major depression - effect of yoga. International Review of Psychiatry, 28(3), 273–278. https://doi.org/10.1080/09540261.2016.1175419 14. Uebelacker, L. A., Eaton, C. B., Weisberg, R., Ackermann, R., Cronin, T., Druker, S., & Battle, C. L. (2017). A pilot randomized controlled trial comparing yoga, health education, and a waitlist control for depression in women. Journal of Psychiatric Research, 95, 156–166. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.08.015 15. World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: Global health estimates. Geneva: World Health Organization. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MSD-MER-2017.2

CÓDIGO: SB0262

AUTOR: ISABEL DA SILVA MENDONCA

COAUTOR: FRANCISCO CANINDE DE SOUSA JUNIOR

COAUTOR: AMANDA SILVA DE ALMEIDA

ORIENTADOR: CRISTIANE FERNANDES DE ASSIS

TÍTULO: EFEITO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO JAMBOLÃO (Syzygium cumini (L.) Skeels)

Resumo

A extração assistida por ultrassom (EAU) de compostos bioativos do jambolão (*Syzygium cumini*) utilizando etanol foi realizada em diferentes tempos (3 a 30 min). Avaliaram-se antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante total (CAT) e sequestro do radical ABTS+. O tempo de extração influenciou significativamente os rendimentos e as propriedades bioativas. O rendimento máximo de AMT (8,45 mg/g) e CAT (36,47 mg AA/g) ocorreu aos 3 min, demonstrando que a sonicação prolongada prejudica a extração de compostos termossensíveis. Para CFT, o maior valor atingido aos 30 min (409,71 µg EAG/g), sem diferença significativa em relação a 20 min (397,70 µg EAG/g), indicando maior estabilidade dos fenólicos não antociânicos. A atividade ABTS+ atingiu o pico aos 20 min (2,40 µmol ET/g), correlacionando-se com a recuperação de compostos fenólicos totais. A EAU mostrou-se altamente eficaz para a obtenção de compostos de interesse do jambolão alcançando aos 3 min o tempo ideal para a preservação de antocianinas e capacidade antioxidante total, enquanto o tempo de 20 min favoreceu a recuperação de fenólicos totais e a capacidade antioxidante via ABTS+.

Palavras-chave: Jambolão. Extração por ultrassom. Antocianinas. Fenólicos.

TITLE: EFFECT OF ULTRASOUND EXTRACTION TIME ON THE RECOVERY OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM JAMBOLAN (Syzygium cumini (L.) Skeels)

Abstract

The ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from jambolan (*Syzygium cumini*) pulp powder using ethanol was conducted at different times (3–30 min). Total monomeric anthocyanins (TMA), total phenolic compounds (TPC), total antioxidant capacity (TAC), and ABTS+ radical scavenging activity were evaluated. Extraction time significantly influenced yields and bioactive properties. The maximum yields of TMA (8.45 mg·g-1) and TAC (36.47 mg AA·g-1) were observed at 3 min, indicating that prolonged sonication impairs the extraction of thermosensitive compounds. Conversely, TPC reached its highest value at 30 min (409.71 µg GAE·g-1), with no significant difference compared to 20 min (397.70 µg GAE·g-1), indicating greater stability of non-anthocyanin phenolics. ABTS activity peaked at 20 min (2.40 µmol TE·g-1), correlating with TPC recovery. UAE is highly effective for processing jambolan: 3 minutes is the ideal time to preserve anthocyanins and reducing power with lower energy consumption, while 20 minutes optimizes total phenolic recovery and ABTS+ antioxidant capacity.

Keywords: Jambolan. Ultrasound-assisted extraction. Anthocyanins. Phenolics.

Introdução

O fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, pertencente à família Myrtaceae, é popularmente conhecido como jambolão, sendo originário do subcontinente indiano e de regiões da Ásia tropical (Freitas *et al*., 2024). Estes frutos apresentam uma rica composição química, sendo constituídos por compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides e taninos (Souza *et al*., 2023). Essa composição confere ao fruto propriedades funcionais com ação antimicrobiana, antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, anticancerígena e antidiabética ao organismo humano (Santos *et al*., 2022).

Em virtude da alta frutificação do jambolão e de sua perecibilidade, ocorre um elevado desperdício desse alimento rico em bioativos (Freitas *et al*. 2024). Sabe-se que, resíduos de frutas como cascas, sementes e polpas são frequentemente descartados, apesar do seu excelente valor nutricional e da presença de metabólitos com características funcionais (Renard *et al*., 2018; Santos *et al*. 2022). Nesse sentido, a extração de compostos bioativos do jambolão é uma estratégia para caracterizar e expandir as aplicações dessa matriz rica em compostos fenólicos.

Aliado aos estudos de compostos bioativos, observa-se também um grande crescimento no desenvolvimento de novos métodos otimizados que buscam aprimorar os processos de extração desses fitoquímicos (Ahmad *et al*., 2020; Altemimi *et al*., 2020; Valu *et al*., 2020; Silva *et al*., 2021). Devido ao alto

rendimento, tempo de processo reduzido, obtenção de produtos de alta qualidade e menos geração de resíduos, as tecnologias verdes vêm tomando cada vez mais espaço em detrimento dos métodos convencionais (Saini *et al.*, 2019). Dentre as tecnologias não convencionais, ou emergentes, destaca-se a extração assistida por ultrassom.

A extração assistida por ultrassom é uma técnica conhecida por reduzir o tempo de extração e o uso de solventes, ao mesmo tempo em que aumenta o rendimento e a qualidade fitoquímica dos extratos (Sabino *et al.*, 2021). Essa tecnologia utiliza ondas ultrassônicas para criar bolhas de cavitação, as quais intensificam a ruptura da parede celular, facilitando a liberação dos compostos da matriz vegetal para o meio extrativo (Rahman *et al.*, 2021). Sabe-se que a modificação de diversas condições experimentais como a razão solvente/sólido aplicada, a temperatura, o tempo de extração e a composição do solvente podem influenciar significativamente a obtenção desses metabólitos (Ávila *et al.*, 2023).

O tipo de solvente a ser utilizado para a extração de fitoquímicos de fontes naturais é uma das variáveis mais estudadas. O etanol está entre os solventes comumente usados para extrair metabólitos vegetais, sendo reconhecido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), oferece uma alternativa segura e sustentável (Hikmawanti *et al.*, 2021; *Rani et al*., 2025). Assim, para se obter as melhores condições de extração, é necessário descobrir as interações entre as variáveis do processo juntamente com seu papel e significância no processo extrativo (Baran *et al*., 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi encontrar as melhores condições para obtenção de substâncias bioativas do jambolão (*Syzygium cumini)* utilizando o método de extração assistida por ultrassom, tendo o etanol como solvente e variando diferentes tempos.

Metodologia

OBTENÇÃO DO FRUTO DE JAMBOLÃO

Os frutos maduros de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) foram obtidos em Nísia Floresta/RN. As amostras foram colhidas de duas árvores cadastradas no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) sob os tombos 28291 (6°3'28"S; 35°12'33"O) e 28292 (6°3'27"S; 35°12'32"O), e registro no SISGEN (nº AE96483).

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A extração assistida por ultrassom (EAU) foi realizada nos tempos de 3, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Foram pesados 4 g do pó de jambolão e adicionados 60 mL

do solvente etanol. A mistura foi submetida a banho ultrassônico (USC-1650, Unique, Indaiatuba/SP) a 25 kHz, potência nominal de 135 W e temperatura ambiente de 25 ºC (Sabino *et al.*, 2021). Os sobrenadantes foram filtrados em papel de celulose e centrifugados a 3.000 rpm por 10 min (5804 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O filtrado foi concentrado em rotaevaporador (R-215, Buchi, Flawil, Suíça) para remoção do solvente, transferido para tubos Falcon de 50 mL e congelado a -80 ºC (-85 Ultra Low Freezer, NuAire, Plymouth/MN, EUA). As amostras foram liofilizadas (L101, Liobrás, São Carlos/SP) por 72 h e armazenadas a -20 ºC até as análises.

DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS

As antocianinas monoméricas totais (AMT) foram quantificadas pelo método do pH diferencial (*Lee et al.*, 2005). Foram preparadas soluções-tampão de cloreto de potássio/ácido clorídrico (KCl/HCl) 0,025 mol/L (pH 1,0) e de acetato de sódio/ácido clorídrico (CH_3CO_2Na/HCl) 0,4 mol/L (pH 4,5). Para cada amostra, empregaram-se dois tubos de ensaio distintos: o primeiro recebeu 400 µL do extrato e 3,6 mL do tampão KCl, e o segundo reuniu 400 µL do extrato com 3,6 mL do tampão CH_3CO_2Na. A elaboração do branco seguiu o mesmo procedimento, trocando-se a alíquota do extrato por 400 µL de água destilada. As análises foram feitas em triplicata, medindo-se as absorbâncias a 520 nm e 700 nm em espectrofotômetro (SP-220, Biospectro, Curitiba/PR). A absorbância final () e o teor de AMT foram calculados pelas Equações 1 e 2 (em anexo), respectivamente.

COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton *et al*. (1999). Em microplaca de 96 poços, adicionaram-se 25 µL de amostra (ou água destilada para o branco), 75 µL de água destilada e 25 µL de reagente Folin-Ciocalteu 50% (v/v). Após 6 min, adicionaram-se 100 µL de Na2CO3 7,5% (m/v). As placas foram mantidas ao abrigo da luz por 90 min, e a absorbância foi lida a 765 nm em leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Winooski/VT, EUA). Os resultados foram expressos em µg de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (µg EAG/g), utilizando curva analítica de ácido gálico (0,25 a 10 µg/mL).

SEQUESTRO DO RADICAL ABTS+

A capacidade de sequestro do radical ABTS+ foi determinada conforme Rufino *et al*. (2007). Em microplaca de 96 poços, adicionaram-se 40 µL de amostra e 260 µL da solução de ABTS+ ((ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) diluída em metanol até obter-se uma absorbância de 0,80 ± 0,02 a 734 nm. Para o preparo do branco, a amostra foi substituída por 40 µL de água

destilada. As leituras de absorbância foram efetuadas a 734 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em µmol de equivalente de Trolox por grama de amostra (µmol ET/g) calculados por curva padrão de Trolox (50 a 500 µmol/mL), gerada anteriormente para esta análise.

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada pela formação do complexo fosfato-molibdênio (Kumaran *et al.*, 2005; Prietro *et al.*, 2005). Em tubos de ensaio (em triplicata), misturaram-se 100 µL de amostra (ou água destilada para o branco), 100 µL de solução de molibdato de amônio/ácido sulfúrico 40 mM, 100 µL de fosfato de sódio e 700 µL de água destilada. Os tubos foram homogeneizados em vórtex (VX-38, IonLab, Araucária/PR) e incubados a 100 ºC por 90 min em banho-maria (Q334M-28, Quimis, Brasil). Após resfriamento, a absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 695 nm. A atividade foi expressa em mg de equivalente de ácido ascórbico por grama de amostra (mg AA/g), com base em curva padrão de ácido ascórbico (50 a 600 µg/mL).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o *software GraphPad Prism 8.0.*

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos (médias ± desvios-padrão) para o teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT), capacidade antioxidante (pelo método ABTS+ e CAT), sob condições de tempo estão apresentados na Tabela 1 (em anexo).

Em relação ao teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), observou-se que o pico extrativo ocorreu no tempo inicial de 3 minutos (8,45 mg/g), valor estatisticamente superior aos tempos de 5, 15 e 30 minutos. Esse declínio indica que o aumento no tempo de sonicação expõe os compostos a um estresse excessivo, onde o colapso das bolhas de cavitação gera forças de cisalhamento e elevações localizadas de temperatura capazes de degradar quimicamente as moléculas de antocianinas (Rani *et al.*, 2025). Assim, a condição de 3 minutos mostrou-se suficiente para atingir o rendimento máximo deste metabólito, dispensando tempos mais longos de processamento.

Para os compostos fenólicos totais (CFT), o comportamento foi oposto ao das AMT. A exposição prolongada de 30 minutos resultou no maior rendimento registrado (409,71 µg EAG/g), valor que não apresentou diferença significativa em relação ao tempo de 20 minutos (397,70 µg EAG/g). Esse perfil pode ser compreendido a partir dos achados de Santos (2023), que identificou na matriz do jambolão outras classes fitoquímicas além das antocianinas, tais como ácidos fenólicos, flavonóis e taninos que apresentam maior estabilidade estrutural sob tratamentos energéticos mais severos do que as antocianinas, o que justifica a manutenção do rendimento de CFT em tempos mais prolongados.

Acerca da atividade antioxidante pelo método ABTS+, o menor valor foi registrado aos 3 minutos (1,68 µmol ET/g). Sendo que a capacidade de sequestro do radical elevou-se com o tempo, atingindo seu pico máximo aos 20 minutos (2,40 µmol ET/g), superior a todas as demais condições testadas. Esse resultado entrou em concordância com a análise de fenólicos totais, que também apresentou rendimentos crescentes em tempos mais prolongados, demonstrando uma forte correlação entre a concentração de fenólicos totais e a capacidade antioxidante do extrato. Essa relação é explicada pela capacidade intrínseca dos compostos fenólicos de atuar como doadores de elétrons ou de átomos de hidrogênio, neutralizando o radical livre ABTS+ por meio de um mecanismo misto de transferência (Enaru *et al.*, 2017; Munteanu *et al*., 2021).

Em contrapartida, na avaliação da capacidade antioxidante total (CAT), o comportamento foi semelhante ao observado para as antocianinas, com a máxima resposta obtida aos 3 minutos (36,47 mg AA/g), superior aos demais tratamentos. Essa diferença entre os ensaios antioxidantes pode ser explicada pelos diferentes mecanismos de reação e condições físico-químicas (pH e temperatura) de cada análise. O método de CAT, baseado no sistema de fosfomolibdênio desenvolvido por Prieto *et al*. (1999), fundamenta-se na redução ácida do metal molibdênio Mo(VI) a Mo(V), processo que é conduzido em meio reacional fortemente ácido pela presença de ácido sulfúrico na solução reagente. Sob baixo pH, as antocianinas da amostra encontram-se majoritariamente na forma de cátion flavílio (Artilha-Mesquita *et al*., 2024) e, por isso, no tempo inicial de 3 minutos, a elevada concentração de antocianinas íntegras atuou para a redução desse complexo metálico, refletindo em uma resposta antioxidante inicial elevada, oposta a ABTS+.

Diante do perfil observado nas diferentes análises, a definição do tempo ideal de extração por ultrassom depende do interesse tecnológico e químico do extrato. O tempo de 3 minutos configurou-se como a condição mais vantajosa para a recuperação de compostos termossensíveis, oferecendo ainda a vantagem operacional de um menor tempo de extração e consequente menor consumo energético. Por outro lado, caso o objetivo seja otimizar a extração da fração fenólica total e a capacidade sequestrante do radical ABTS+, a condição de 20 minutos apresentou-se como o ponto de equilíbrio do processo, atingindo teores equivalentes ao tempo máximo testado.

Conclusão

O estudo demonstrou a eficiência da extração assistida por ultrassom (EAU) na obtenção de compostos bioativos de *S. cumini*, evidenciando que o tempo de sonicação modula a seletividade da extração e a estabilidade do perfil de metabólitos. Verificou-se uma dinâmica distinta entre as classes: a preservação de estruturas termossensíveis exige tempos reduzidos de exposição, enquanto a liberação de compostos fenólicos de maior estabilidade e elevado potencial antioxidante requer um processamento mais prolongado, atingindo um platô operacional que inviabiliza extensões adicionais de tempo. Assim, a definição do parâmetro temporal da EAU deve ser guiada pelo perfil fitoquímico de interesse, viabilizando a aplicação estratégica do jambolão no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.

Referências

AHMAD, A. et al. Box–Behnken Response Surface Design of Polysaccharide Extraction from Rhododendron arboreum and the Evaluation of Its Antioxidant Potential, Molecules, v. 25, n. 17, p. 3835, 24 ago. 2020. DOI: 10.3390/molecules25173835.

ALTEMIMI, A. B. et al. Optimization of Ultrasonicated Kaempferol Extraction from Ocimum basilicum Using a Box–Behnken Design and Its Densitometric Validation, Foods, v. 9, n. 10, p. 1379–1379, 29 set. 2020. DOI: 10.3390/foods9101379.

ARTILHA-MESQUITA, C. A. F et al. Extraction of bioactive compounds from the fruits of Jambolan (syzygium cumini (l.)) Using alternative solvents, Plants, v. 13, n. 15, p. 2065–2065, 26 jul. 2024. DOI: 10.3390/plants13152065.

ÁVILA, S. et al. Ultrasound-Assisted extraction optimization of Polyphenols from Jambolão (syzygium cumini) fruit and their in Vitro antioxidant capacity, Food science today, v. 1, n. 1, 25 jan. 2023. DOI: 10.58951/fstoday.v1i1.13.

BARAN, A. D., GOUD, V. V., DAS, C. Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (Oryza sativa L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling,Industrial Crops and Products, v. 95, p. 332–341, Jan. 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.10.041.

ENARU, B. et al. Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation, Antioxidants, v. 10, n. 12, p. 1967, 9 dez. 2021. DOI: 10.3390/antiox10121967.

FREITAS, B. A. G. et al. Obtenção e caracterização de pó de polpa com casca de jambolão por meio de secagem em leito de espuma, Research, society and development, v. 13, n. 12, p. e81131247577, 5 dez. 2024. DOI: 10.33448/rsd-v13i12.47577.

HIKMAWANTI, N. P. E., FATMAWATI, S., ASRI, A. W. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (Sauropus androgynus (L.) Merr.) Leaves Extracts, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 755, n. 1, p. 012060, 1 abr. 2021. DOI: 10.1088/1755-1315/755/1/012060.

KUMARAN, A.; JOEL KARUNAKARAN, R. "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India," LWT - Food Science and Technology, v. 40, n. 2, p. 344–352, Mar. 2007. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.09.011.

LEE, J. et al. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study, Journal of AOAC INTERNATIONAL, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 1 set. 2005. DOI: 10.1093/jaoac/88.5.1269.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review, International journal of Molecular sciences, v. 22, n. 7, p. 3380, 25 mar. 2021. DOI: 10.3390/ijms22073380.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E, Analytical Biochemistry, v. 269, n. 2, p. 337–341, May 1999. DOI: 10.1006/abio.1999.4019.

RAHMAN, M. M.; LAMSAL, B. P. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2 fev. 2021. DOI: 10.1111/1541-4337.12709.

RANI, U. et al. Effect of Ultrasound on the extraction of bioactive compounds from Jamun (syzygium cumini l.) Seeds, Biomass conversion and biorefinery, v. 15, 21 jan. 2025. DOI: 10.1007/s13399-025-06516-6.

RENARD, C. M. G. C. Extraction of bioactives from Fruit and vegetables: State of the art and perspectives, LWT, v. 93, p. 390–395, jul. 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.03.063.

RUFINO, M. S. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH Introdução. 2007. Anais [...] [S.l: s.n.], 2007. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf. Acesso em: 22 jul. 2026.

SABINO, L. B. S. et al. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (Syzygium cumini L.), Food and Bioproducts Processing, v. 127, p. 77–89, maio 2021. DOI: 10.1016/j.fbp.2021.02.012.

SAINI, A.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B. Valorization of fruits and vegetables waste through green extraction of bioactive compounds and their nanoemulsions-based delivery system, Bioresources and Bioprocessing, v. 6, n. 1, 25 jul. 2019. DOI: 10.1186/s40643-019-0261-9.

SANTOS, A. E. et al. Impact of drying method as pretreatment for extraction of bioactive compounds from jambolan (Syzygium cumini (L.) Skeels), Brazilian journal of food technology/Brazilian Journal of Food Technology, v. 25, 1 jan. 2022a. DOI: 10.1590/1981-6723.05521.

SANTOS, J. A. B. Extração e encapsulação de antocianinas e outros compostos fenólicos do jambolão (Syzygium cumini (L.) Skeels). Orientadora:

Dra. Juliana Kelly da Silva Maia. 2023. 100f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

SILVA, R. S. et al. Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da espécie Caryocar brasiliense, Research, Society and Development, v. 10, n. 9, p. e41310916493, 29 jul. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.16493.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Methods in Enzymology, v. 299, p. 152–178, 1999. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)99017-1.

SOUZA, L. S et al. Estudo do potencial nutricional e funcional de frações do jambolão syzygium cumini (l.): uma revisão, Saúde.com, v. 19, n. 4, 15 jan. 2023. DOI: 10.22481/rsc.v19i4.14009.

VALU, M.-V. et al. Optimization of Ultrasonic Extraction to Obtain Erinacine A and Polyphenols with Antioxidant Activity from the Fungal Biomass of Hericium erinaceus, Foods, v. 9, n. 12, p. 1889, 18 dez. 2020. DOI: 10.3390/foods9121889.

Anexos



Equações 1 e 2. Onde: A = Absorbância; PM = Peso Molecular (493.20 g/mol para malvidina-3-glicosídeo); FD = Fator de Diluição; AM = Absortividade molar da antocianina (28.000 L·mol-1·cm-1); L= Caminho óptico (1cm).



Tabela 1. Teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (ABTS+ e CAT) de extratos do pó de jambolão obtidos por EAU.

CÓDIGO: SB0280

AUTOR: FERNANDO DA SILVA ALVES

ORIENTADOR: CARLOS ROBERTO SORENSEN DUTRA DA FONSECA

TÍTULO: Trade-off entre número e tamanho dos pólens em Asteraceae européias

Resumo

Asteraceae é a maior família botânica em termos de espécies, ocupando os mais diversos ambientes e possuindo diversas espécies de interesse econômico. Para entender plenamente a reprodução e evolução desse grupo, é necessário compreender como a alocação de recursos afeta a produção de suas estruturas reprodutivas. Nesse estudo investigamos se há uma relação de compensação (trade-off) na alocação de recursos entre o tamanho e o número de pólen de 98 espécies de Asteraceae nativas do continente europeu. Medimos as dimensões de 10 polens de cada espécie e comparamos com dados de contagem direta do número de pólen por espécie por meio de regressão linear para avaliar a presença desse trade-off, que já é reconhecido na literatura em diversas outras famílias botânicas. Em contraste com o esperado, foi encontrada uma relação positiva, mas não significativa, entre o tamanho e o número de pólen, o que descaracteriza uma relação de trade-off. Concluímos que essa relação pode não ocorrer no grupo estudado, e destacamos a importância de estudos mais robustos para chegar a um resultado conclusivo.

Palavras-chave: Compositae, características reprodutivas masculinas, compensação.

TITLE: Investigating a pollen size–number trade-off in European Asteraceae.

Abstract

Asteraceae is the largest botanical family in terms of species, occupying a wide variety of environments and including numerous species of economic interest. To fully understand the reproduction and evolution of this group, it is necessary to understand how resource allocation affects the production of its reproductive structures. In this study, we investigated whether there is a trade-off in resource allocation between pollen size and pollen number among 98 Asteraceae species native to the European continent. We measured the dimensions of 10 pollen grains from each species and compared them with direct-count data on

pollen number per species using linear regression to assess the presence of this trade-off, which has already been recognized in the literature for several other botanical families. Contrary to expectations, we found a positive but non-significant relationship between pollen size and pollen number, which does not support the existence of a trade-off. We conclude that this relationship may not occur in the group studied and highlight the importance of more robust studies to reach a conclusive result.

Keywords: Compositae, male reproductive traits, compensation.

Introdução

As Asteraceae, como os girassóis, margaridas e crisântemos, possuem cerca de 25.000 a 35.000 espécies e representam aproximadamente 10% de todas as Angiospermas conhecidas (Funk et al., 2009; Mandel et al., 2019). É a maior família botânica em termos de espécies, tendo 16 subfamílias e 50 tribos (Panero & Crozier, 2016; Mandel et al., 2019; Susanna et al., 2020).

Os representantes dessa família estão amplamente distribuídos pelo mundo, desde regiões próximas aos polos até os trópicos, ocupando uma grande diversidade de hábitats, incluindo desertos, florestas tropicais, ambientes alpinos, pântanos e outros ambientes aquáticos (Palazzesi et al., 2022). Dentre elas, estão várias plantas de interesse econômico, assim como plantas medicinais, alimentícias e ervas daninhas. Devido a isso, o grupo vem sendo intensamente estudado em diversos aspectos, como reprodução, morfologia, ecologia, fitoquímica e citogenética, desde a década de 70 (Bremer, 1996).

A reprodução representa um dos processos mais custosos do ciclo de vida das plantas, exigindo a distribuição de recursos limitados entre crescimento, manutenção e produção de estruturas reprodutivas. Dessa forma, compreender como esses recursos são alocados entre os diferentes componentes da reprodução é fundamental para entender as estratégias reprodutivas e a evolução das plantas (Pérez-Martínez et al., 2021). A produção de pólen representa um importante componente do investimento reprodutivo masculino, e a alocação de recursos entre o tamanho e a quantidade de grãos de pólen pode refletir um trade-off decorrente da limitação de recursos disponíveis para a reprodução (Vonhof & Harder, 1995).

O trade-off, ou compensação, entre o número de pólen e o tamanho dos grãos de pólen já é uma relação conhecida em diversas famílias botânicas, como sugerido por Hao (2020), onde sua análise, realizada com 80 espécies de 25 famílias distintas, apontou que plantas com maior número de pólen tinham grãos de pólen menores, e o inverso também foi notado. Porém, estudos como esse são escassos quando voltamos o olhar para as Asteraceae e, para que haja o pleno conhecimento a respeito da ecologia reprodutiva e evolutiva do grupo, investigações como essa se fazem necessárias.

O objetivo dessa pesquisa é analisar o pólen de 98 espécies pertencentes às Asteraceae, oriundas do continente Europeu, a fim de gerar dados inéditos

sobre o tamanho médio do pólen dessas espécies e verificar a presença de uma correlação negativa (trade-off) entre o tamanho e o número do pólen das mesmas. Acreditamos que essa relação possa ser encontrada nas Asteraceae, assim como já foi verificada em diversas outras espécies vegetais por Vonhof e Harder. (1995)

Metodologia

1.0 COLETA DE DADOS

Os dados foram obtidos através da análise de amostras pertencentes a 98 espécies da família Asteraceae coletadas previamente na Europa. A seleção das amostras foi realizada em laboratório com o auxílio de um estereoscópio binocular (lupa). Dentre as amostras trazidas da Alemanha, foi selecionado um capítulo e, dentro desse capítulo, foram escolhidas apenas flores fechadas e bem conservadas, para não comprometer a contagem de pólen.

A contagem de pólen foi feita pelo método de contagem direta, utilizando apenas 1 flor por espécie. Inicialmente, foram utilizadas duas agulhas de seringa e um estereoscópio binocular para manusear e dissecar as partes do capítulo com precisão, selecionando apenas uma flor fechada e o mais bem preservada possível. Após essa etapa, a flor selecionada foi depositada em um Eppendorf e macerada usando a ponta de um palito de madeira. Em seguida, adicionamos 1000 microlitros de ácido lático a 85% de concentração no Eppendorf e homogeneizamos a amostra em um vórtex durante 3 minutos. Para a contagem, foram aplicados 100 microlitros da amostra em uma lâmina com uma pipeta automática de volume variável. Em seguida, a amostra foi coberta com uma lamínula e analisada no microscópio óptico, com lente de 10x. O método de contagem direta se baseia em fazer uma varredura na lâmina, contando os pólens 1 por 1, com a ajuda de um contador manual analógico. Esse processo foi repetido 10 vezes por espécie, até que todo o conteúdo do Eppendorf fosse analisado. Em seguida, os valores das 10 contagens foram somados, para chegar ao número total de pólen por flor da espécie. Os dados foram armazenados em uma planilha para serem utilizados na análise estatística.

A segunda etapa foi a medição dos pólens, onde os dados de altura e largura de 10 pólens de cada espécie foram coletados. Inicialmente, foram utilizadas duas agulhas de seringa e um estereoscópio binocular para selecionar de uma a 5 flores, variando de acordo com o tamanho da flor e a quantidade de pólen disponível por espécie. As flores foram abertas em cima de uma lâmina, e o pólen em seu interior foi raspado com a ajuda das agulhas e depositado sobre a lâmina. Em seguida, foram adicionados 100 microlitros de água e cobertos com uma lamínula para finalizar a amostra. Essa amostra foi analisada em um microscópio óptico Nikon Eclipse Ni-U com câmera DS-Ril acoplada e, através do software NIS-Elements AR 4.00.03 (64 bits), medimos os 10 pólens, usando

a maior medida como altura e a menor medida como a largura. Os dados foram salvos em uma planilha para serem utilizados nas análises estatísticas.

1.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A primeira análise visa entender como as espécies estão distribuídas em relação ao tamanho médio da altura e da largura do pólen. Em seguida, foram calculadas as estatísticas descritivas, incluindo os valores: mínimo; 1º quartil; mediana; média; 3º quartil e máximo. A segunda análise foi uma regressão linear entre largura e altura do pólen, sendo a média da largura a variável explicativa, enquanto a média da altura é a variável resposta. Essa análise testa se espécies com grãos de pólen mais largos também tendem a apresentar grãos mais altos.

A terceira parte é uma análise gráfica da variação intra e interespecífica, utilizando boxplots, onde cada boxplot representa uma espécie, sendo possível visualizar simultaneamente a variação intraespecífica, observada pela dispersão dos valores dentro de cada espécie, e a variação interespecífica, observada pelas diferenças entre as espécies. As espécies foram ordenadas da maior para a menor média de altura e largura. A quarta análise é uma ANOVA, modelo aplicado para descobrir quanto a altura e a largura dos grãos de pólen diferem entre as espécies e qual proporção da variação total ocorre entre espécies versus dentro das espécies.

Para analisar a presença de trade-off entre tamanho e número de pólen nas espécies analisadas, inicialmente foi feita a média entre a altura e largura médias do pólen de cada espécie, para obter um valor que representasse o tamanho do pólen. Em seguida, foi utilizada uma regressão linear simples, onde o tamanho do pólen foi a variável resposta e a quantidade de pólen foi a variável explicativa, com o intuito de verificar se havia relação entre as duas variáveis.

Resultados e Discussões

Para a análise de distribuição foram criados 2 histogramas independentes, abordando a distribuição das espécies em relação a altura e largura do pólen. Em ambos os histogramas é possível observar uma maior concentração de espécies em valores médios de altura e largura do pólen, sendo escassas as espécies com pólen muito alto ou muito largo, assim como as espécies com medidas muito baixas de altura e largura do pólen.

Também foram calculados as estatísticas descritivas para os valores de altura e largura do pólen das espécies analisadas (em micrômetros), sendo as estatísticas da altura: Mínimo: 4,82; Primeiro Quartil: 25,47; Mediana: 32,73 Média: 33,61; Terceiro Quartil: 36,99; Máximo: 79,27. Já para a largura, as

estatísticas foram: Mínimo: 4,35; Primeiro Quartil: 25,52; Mediana: 29,70; Média: 30,88; Terceiro Quartil: 34,66; Máximo: 57,45.

Na regressão linear entre altura e largura dos polens, a altura dos grãos de pólen apresentou uma relação forte e positiva com a largura entre as espécies. A regressão linear explicou 93,5% da variação na altura média dos grãos de pólen ($R^2 = 0,935$), sendo a relação altamente significativa ($F = 1379$, $p < 2.2e-16$; $n = 98$). Assim, as espécies com grãos de pólen mais largos tenderam também a apresentar maior altura dos grãos.

Já no ANOVA, foi verificado que as dimensões dos grãos de pólen diferiram significativamente entre as espécies. A identidade da espécie foi responsável por aproximadamente 94,5% da variação total na altura e 92,9% da variação total na largura dos grãos de pólen. A variação residual dentro das espécies correspondeu a 5,5% e 7,1%, respectivamente. Esses resultados indicam que a variação nas dimensões dos grãos de pólen ocorre predominantemente entre espécies.

Já na regressão linear entre número e tamanho de pólen, não foi detectada relação significativa entre o número e o tamanho dos grãos de pólen entre as espécies (regressão linear: $F = 3,13$; $R^2 = 0,034$; $p = 0,080$). O número de grãos explicou apenas 3,4% da variação no tamanho do pólen, e a relação encontrada foi levemente positiva, porém não significativa.

Uma das teorias centrais da evolução reprodutiva das plantas sugere uma correlação negativa (trade-off) entre o número de módulos reprodutivos e o investimento por módulo (Burd, 1999). Essa relação já é bem conhecida na literatura, também estando presente em outras estruturas, como entre tamanho e número de folhas (Whitman & Aarssen, 2010). Correlações negativas entre o número e o tamanho do pólen já foram relatadas em várias espécies, indicando um trade-off na alocação de recursos (Vonhof e Harder, 1995). No presente estudo, esperávamos verificar essa relação negativa, mas nossos resultados encontraram uma relação positiva, porém não significativa($p=0,08$), entre o tamanho e o número de pólen, o que já descaracteriza um trade-off, sugerindo a ausência dessa relação nas espécies analisadas.

Estudos sugerem que essa relação pode ser afetada por fatores externos em outras espécies vegetais, como demonstrado por Waesch et al.(2026) através do estudo com o Centeio (Secale cereale), onde, sob condições de enriquecimento de nutrientes, foi observado uma correlação negativa entre o tamanho do pólen e a contagem de grãos de pólen, sugerindo um trade-off na alocação de recursos, enquanto em condições de deficiência de nutrientes essa relação esteve ausente, demonstrando que a disponibilidade de nutrientes no solo pode interferir na presença de trade-off entre tamanho e número de pólen em plantas polinizadas pelo vento.

Já em plantas polinizadas por animais, como as Asteraceae, é conhecido que a disponibilidade de nutrientes no solo, particularmente de nitrogênio e fósforo, pode influenciar características reprodutivas, como a produção de flores, a quantidade e composição do néctar, e as características do pólen, como

tamanho e quantidade . Níveis mais elevados de nutrientes no solo incrementaram essas características, influenciando positivamente as interações entre plantas e polinizadores (Vaudo et al., 2022; Gao et al., 2023). Sendo assim, é possível que variáveis como essa estejam modulando a presença dessa relação dentro das espécies analisadas nesse estudo.

Conclusão

Esse estudo trouxe dados inéditos a respeito das dimensões do pólen das Asteraceae europeias e de como essas dimensões variam interespecificamente e intraespecificamente, sugerindo a predominância da variação interespecífica. Alcançamos um resultado inesperado relacionado ao objetivo principal, sendo então concluído que pode não haver a relação de trade-off entre tamanho e número de pólen nas espécies analisadas, mesmo sendo uma relação conhecida em diversas outras famílias botânicas. Além disso, consideramos que um estudo que analise mais espécies e mais indivíduos por espécie, além de considerar um grupo maior de variáveis e análises filogenéticas é importante para alcançar um resultado mais robusto e conclusivo sobre o tema no futuro.

Referências

Bremer, K. (1996). Major clades and grades of the Asteraceae. In D. J. N. Hind & H. J. Beentje (Eds.), Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994 (Vol. 1, pp. 1–7). Royal Botanic Gardens, Kew.

Burd, M. (1999). Flower number and floral components in ten angiosperm species: An examination of assumptions about trade-offs in reproductive evolution. Biological Journal of the Linnean Society, 68(4), 579–592. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01189.x

Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Robinson, H. (2009). Classification of Compositae. In V. A. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy, & R. J. Bayer (Eds.), Systematics, evolution, and biogeography of Compositae (pp. 171–189). International Association for Plant Taxonomy.

Gao, R., Hu, B., Yuan, Y., He, M., Wang, R., Lou, Y., & Mu, J. (2023). Nitrogen addition affects floral and vegetative traits, reproduction, and pollinator performance in Capsicum annuum L. Annals of Botany, 132(6), 1131–1144. https://doi.org/10.1093/aob/mcad121

Hao, K., Tian, Z.-X., Wang, Z.-C., & Huang, S.-Q. (2020). Pollen grain size associated with pollinator feeding strategy. Proceedings of the Royal Society B:

Biological Sciences, 287(1933), 20201191. https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1191

Mandel, J. R., Dikow, R. B., Siniscalchi, C. M., Thapa, R., Watson, L. E., & Funk, V. A. (2019). A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(28), 14083–14088. https://doi.org/10.1073/pnas.1903871116

Palazzesi, L., Pellicer, J., Barreda, V. D., Loeuille, B., Mandel, J. R., Pokorny, L., Siniscalchi, C. M., Tellería, M. C., Leitch, I. J., & Hidalgo, O. (2022). Asteraceae as a model system for evolutionary studies: From fossils to genomes. Botanical Journal of the Linnean Society, 200(2), 143–164.

Panero, J. L., & Crozier, B. S. (2016). Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. Molecular Phylogenetics and Evolution, 99, 116–132. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.007

Pérez-Martínez, E., & Méndez, M. (2021). Reproductive allocation in plants: A reappraisal of the currency issue. Nordic Journal of Botany, 39(6), e03034. https://doi.org/10.1111/njb.03034

Susanna, A., Baldwin, B. G., Bayer, R. J., Bonifacino, J. M., Garcia-Jacas, N., Keeley, S. C., Mandel, J. R., Ortiz, S., Robinson, H., & Stuessy, T. F. (2020). The classification of the Compositae: A tribute to Vicki Ann Funk (1947–2019). Taxon, 69(4), 807–814. https://doi.org/10.1002/tax.12235

Vaudo, A. D., Erickson, E., Patch, H. M., Grozinger, C. M., & Mu, J. (2022). Impacts of soil nutrition on floral traits, pollinator attraction, and fitness in cucumbers (Cucumis sativus L.). Scientific Reports, 12, 21802. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26164-4

Vonhof, M. J., & Harder, L. D. (1995). Size–number trade-offs and pollen production by papilionaceous legumes. American Journal of Botany, 82(2), 230–238. https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb11491.x

Waesch, C., Gaede, N., Wulff, M., Ferhat, I., Nagel, M., Dunker, S., & Dreissig, S. (2026). Influence of long-term nutrient deficiency on pollen and anther morphological traits in rye. Journal of Experimental Botany, 77(6), 1903–1916. https://doi.org/10.1093/jxb/eraf537

Whitman, T., & Aarssen, L. W. (2010). The leaf size/number trade-off in herbaceous angiosperms. Journal of Plant Ecology, 3(1), 49–58. https://doi.org/10.1093/jpe/rtp018

Anexos



Figura 1. Distribuição das dimensões médias dos grãos de pólen das 98 espécies analisadas. (A) Distribuição das espécies de acordo com a altura média do pólen (µm). (B) Distribuição das espécies de acordo com a largura média do pólen (µm).



Figura 2. Relação entre a largura média e a altura média dos grãos de pólen das 98 espécies analisadas. Cada ponto representa uma espécie. A linha preta representa a regressão linear entre a largura e a altura médias dos grãos de pólen.



Figura 3. Variação intra e interespecífica nas dimensões dos grãos de pólen das 98 espécies analisadas. (A) Distribuição da altura média dos grãos de pólen (µm). (B) Distribuição da largura média dos grãos de pólen.



Figura 4. Relação entre o número e o tamanho médio dos grãos de pólen das 98 espécies analisadas. A linha representa o ajuste da regressão linear simples e a área sombreada representa o intervalo de confiança de 95%.

CÓDIGO: SB0291

AUTOR: WESLLEN DHENMYZ BRITO FERREIRA

COAUTOR: MATEUS AMARAL DA SILVA

COAUTOR: IGOR YAN IDUINO FREIRE

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Diversidade de Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) e seus Parasitoides (Hymenoptera: Braconidea) na Zona de Proteção Ambiental 7 (ZPA-07) – Forte dos Reis Magos e seu Entorno

Resumo

As moscas-das-frutas (*Diptera: Tephritidae*) possuem importância ecológica e econômica por estarem associadas a diversas plantas hospedeiras e parasitoides. Este trabalho teve como objetivo realizar o levantamento de moscas-das-frutas e parasitoides associados a frutos coletados na Zona de Proteção Ambiental 07 (ZPA-07), Mata do Forte, em Natal/RN. As coletas foram realizadas quinzenalmente, com coleta de frutos e uso de armadilhas, tendo os pontos registrados por georreferenciamento. No laboratório, os frutos foram pesados, acondicionados em vermiculita e peneirados semanalmente para obtenção de pupas e posterior emergência dos insetos. Os exemplares foram preservados em álcool 70%, separados, contados, sexados e identificados por características morfológicas e chaves de identificação. Entre os frutos coletados, apenas *Terminalia catappa (*castanhola*)* apresentou emergência de moscas-das-frutas, com 123 indivíduos de *Anastrepha fraterculus* e 107 de *Ceratitis capitata*. Também foram obtidos 12 exemplares do parasitoide *Doryctobracon areolatus* associados a *Terminalia catappa*. Nas armadilhas, foram registrados seis indivíduos de *Anastrepha fraterculus* e 12 de *Ceratitis capitata*. Os resultados ampliam o conhecimento sobre essas espécies na ZPA-07 e destacam a importância do monitoramento da biodiversidade em áreas de proteção ambiental inseridas em ambientes urbanos.

Palavras-chave: monitoramentoconservação ambientalpragas agrícolas

TITLE: Diversity of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) and their Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) in Environmental Protection Zone 7 (ZPA-07) – Forte dos Reis Magos and its Surroundings

Abstract

Fruit flies (*Diptera: Tephritidae*) are of ecological and economic importance, being associated with various host plants and parasitoid organisms. This study aimed to survey fruit flies and parasitoids associated with fruits collected in Environmental Protection Zone 07 (ZPA-07)—specifically the Mata do Forte area in Natal, Rio Grande do Norte—thereby contributing to the knowledge of the local entomofauna. Sampling was conducted biweekly using both fruit collection and traps, with collection points recorded via georeferencing. In the laboratory, fruits were weighed, placed in vermiculite, and subjected to weekly sifting to recover pupae and allow for subsequent insect emergence. Specimens were preserved in 70% alcohol, sorted, counted, sexed, and identified using morphological characteristics and identification keys. Among the collected fruits, only *Terminalia catappa* (tropical almond, Carl Linnaeus, 1767) yielded emerging fruit flies, resulting in 123 individuals of *Anastrepha fraterculus* and 107 of *Ceratitis capitata*. Twelve specimens of the parasitoid *Doryctobracon areolatus* were also obtained from the *Terminalia catappa* samples. Trapping yielded six individuals of *Anastrepha fraterculus* and 12 of *Ceratitis capitata*. These results complement existing knowledge regarding the occurrence of these species in ZPA-07 and underscore the importance of monitoring biodiversity in environmental protection areas located within urban environments.

Keywords: monitoringenvironmental conservationagricultural pests

Introdução

As moscas-das-frutas (*Diptera: Tephritidae*) são insetos de importância econômica e ecológica, especialmente pela estreita relação que mantêm com plantas hospedeiras e pelos danos ocasionados aos frutos. Entre os principais gêneros registrados no Brasil destacam-se *Anastrepha* (Wiedemann, 1830), nativo da região Neotropical, e *Ceratitis* (Wiedemann, 1824), representado principalmente pela espécie exótica *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824). As fêmeas depositam os ovos nos frutos por meio do ovipositor, e as larvas se desenvolvem no interior destes, alimentando-se dos tecidos vegetais. A oviposição pode ainda favorecer a entrada de microrganismos, contribuindo para a deterioração e a queda dos frutos (LIMA; MALAVASI, 1997; ZART; FERNANDES; BOTTON, 2009). Além dos prejuízos à produção, as moscas-das-frutas apresentam relevância para a agricultura devido às exigências e barreiras fitossanitárias associadas ao comércio de frutas (MALAVASI; ZUCCHI, 2000).

Do ponto de vista ecológico, os tefritídeos participam de complexas interações com as plantas hospedeiras e com outros organismos, especialmente seus parasitoides, que

podem atuar na regulação natural de suas populações. A diversidade de hospedeiros e as relações estabelecidas com parasitoides fazem desses insetos componentes relevantes das comunidades vegetais e entomológicas, de modo que o conhecimento de sua ocorrência e de suas associações ecológicas contribui para a compreensão da dinâmica desses organismos nos diferentes ambientes (ALUJA; MONTES DE OCA, 1999). Nesse contexto, levantamentos da diversidade de tefritídeos e de seus inimigos naturais podem fornecer informações importantes tanto para o conhecimento da biodiversidade quanto para o monitoramento de espécies de interesse econômico.

As Zonas de Proteção Ambiental (ZPAs) desempenham papel importante na conservação da biodiversidade em áreas urbanas, ao proteger remanescentes de vegetação e ambientes naturais inseridos na matriz urbana. A Zona de Proteção Ambiental 07 (ZPA-07), localizada em Natal, Rio Grande do Norte, compreende o Forte dos Reis Magos e seu entorno, na região da foz do rio Potengi, entre ambientes costeiros e estuarinos. A área apresenta remanescentes de vegetação associados a esses ambientes, que podem oferecer recursos e abrigo para diferentes grupos de insetos (NATAL, 2008). Assim, o levantamento da entomofauna na ZPA-07 pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade local e sobre as relações entre insetos, plantas hospedeiras e parasitoides.

O monitoramento de moscas-das-frutas também possui relevância para o Rio Grande do Norte, considerando a importância da atividade frutícola no estado e a necessidade de acompanhamento fitossanitário dessas espécies (ARAUJO; FERNANDES, 2023). Entretanto, ainda são limitadas as informações sistematizadas sobre a ocorrência de tefritídeos, seus parasitoides e a entomofauna associada na ZPA-07. O conhecimento desses organismos pode fornecer uma base para a caracterização da fauna local, permitindo registrar espécies e suas associações com plantas hospedeiras em uma área protegida inserida no ambiente urbano.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar o levantamento de moscas-das-frutas (*Diptera: Tephritidae*), seus parasitoides e a entomofauna associada em frutos coletados na Zona de Proteção Ambiental 07 (ZPA-07), no Forte dos Reis Magos e seu entorno. Especificamente, buscou-se obter e identificar adultos de Tephritidae e seus parasitoides a partir dos frutos coletados, contribuindo para o conhecimento da diversidade entomológica da área e fornecendo informações para futuras ações de monitoramento e conservação.

Metodologia

Área e período de coleta

O estudo foi realizado na Zona de Proteção Ambiental 07 (ZPA-07), localizada na região do Forte dos Reis Magos e seu entorno, na foz do rio Potengi, em Natal, Rio Grande do Norte. A área apresenta vegetação costeira e ambiente estuarino, sendo de importância ambiental, histórica e turística. As coletas foram realizadas quinzenalmente, entre setembro de 2025 e agosto de 2026, priorizando frutos encontrados no solo em estágio de maturação ou com sinais de possível infestação por moscas-das-frutas.

Coleta e georreferenciamento

Foram coletados frutos hospedeiros encontrados no solo, utilizando-se sacolas, luvas e pinças. Em cada ponto, as coordenadas geográficas foram registradas com celular equipado com GPS e o aplicativo Timestamp Camera (versão 1.252), que também foi utilizado para o registro fotográfico dos frutos. As coordenadas foram apresentadas em formato decimal nas imagens, facilitando a organização e identificação dos pontos de coleta.

Também foram utilizadas armadilhas do tipo McPhail, contendo proteína hidrolisada Biofly a 5% como atrativo alimentar. As armadilhas foram instaladas em pontos estratégicos da vegetação para a captura de adultos de Tephritidae. Após as coletas, os frutos foram transportados ao laboratório para processamento.

Processamento dos frutos e obtenção das pupas

No laboratório, os frutos foram pesados em balança analógica, realizando-se pesagens sucessivas quando necessário. Em seguida, foram acondicionados em bandejas ou recipientes plásticos contendo vermiculita hidratada, conforme Nascimento et al. (2000). Os recipientes foram cobertos com tecido voil e identificados com informações sobre localidade, data e fruto hospedeiro.

As amostras permaneceram em incubação e foram submetidas a três peneirações semanais. Em cada procedimento, a vermiculita era peneirada para recuperação das pupas. As pupas obtidas foram transferidas para recipientes plásticos e acondicionadas em cubos de acrílico para a emergência dos adultos. Os cubos foram identificados de acordo com a amostra de origem e monitorados semanalmente.

Os insetos emergidos foram coletados com pinça entomológica ou pincel fino e preservados em álcool etílico a 70%. Após a terceira peneiração, os frutos foram descartados e a vermiculita foi autoclavada. Os recipientes de emergência foram mantidos por mais sete dias para verificar novas emergências e, posteriormente, o material foi descartado e os cubos higienizados.

Triagem, contagem e sexagem

Os insetos emergidos foram separados sob estereomicroscópio em três grupos: moscas-das-frutas (*Tephritidae*), parasitoides (*Hymenoptera*) e demais insetos associados. Os espécimes foram armazenados em frascos de vidro contendo álcool etílico a 70%, com etiquetas contendo localidade, data e fruto hospedeiro.

Os Tephritidae foram contados individualmente sob estereomicroscópio e posteriormente sexados. A diferenciação entre machos e fêmeas foi realizada principalmente pela presença do ovipositor nas fêmeas.

Identificação das moscas-das-frutas

Nas fêmeas, o acúleo foi removido sob estereomicroscópio e montado em lâminas de vidro. Para a identificação, foram consideradas características morfológicas externas e a morfologia do acúleo. Foram utilizadas a chave geral apresentada em Moscas-das-frutas

de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado (Malavasi; Zucchi, 2000) e a chave pictórica regional apresentada em Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) no Rio Grande do Norte, Brasil: Diversidade, Aspectos Ecológicos e Morfometria (Basílio, 2025).

Foram observados principalmente os padrões de coloração das asas, incluindo as faixas costal, em "S" e em "V" invertido, além das características do acúleo, como formato e comprimento do ápice, largura, abertura do oviduto e presença de dentes apicais.

As lâminas foram preparadas com uma gota de glicerina, na qual o acúleo foi posicionado e coberto com lamínula. As estruturas foram analisadas em microscópio óptico e, quando disponível, foram obtidas imagens e medidas utilizando estereomicroscópio Motic SMZ-168, câmera digital Motic 5+ e o software Motic Images Plus 2.0 ML.

Após a identificação, os espécimes foram mantidos em álcool etílico a 70% e tiveram suas etiquetas atualizadas com a espécie, localidade, data da coleta e fruto hospedeiro.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Durante o período de amostragem, foram coletados frutos de *Anacardium occidentale L.* (caju), *Tamarindus indica L.* (tamarindo), *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.), *Hauenschild* (juá), *Alternanthera philoxeroides* (Mart.), *Griseb*. (erva-de-jacaré), *Passiflora mucronata* (maracujazinho-da-praia) e *Terminalia catappa L.* (castanhola). Entre os frutos analisados em laboratório, somente *Terminalia catappa* apresentou emergência de moscas-das-frutas.

A partir dos frutos de *Terminalia catappa*, foram obtidos 230 adultos de *Tephritidae*, sendo 123 indivíduos de *Anastrepha fraterculus (*Wiedemann, 1830*)* e 107 de *Ceratitis capitata (*Wiedemann, 1824*)*. Entre os exemplares de *Anastrepha fraterculus*, foram identificadas 67 fêmeas e 56 machos, enquanto *Ceratitis capitata* apresentou 55 fêmeas e 52 machos.

Também foram obtidos exemplares por meio das armadilhas. Foram capturados 18 adultos, sendo seis indivíduos de *Anastrepha fraterculus*, compostos por cinco fêmeas e um macho, e 12 indivíduos de *Ceratitis capitata*, sendo nove fêmeas e três machos.

No total, considerando os indivíduos provenientes dos frutos e das armadilhas, foram registrados 248 adultos de *Tephritidae*, sendo 129 *Anastrepha fraterculus* e 119 *Ceratitis capitata*.

Entre os insetos emergidos dos frutos de *Terminalia catappa*, foram obtidos 12 indivíduos de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911), sendo três fêmeas e nove machos. Os parasitoides foram observados nas amostras nas quais também ocorreu a

emergência de *Anastrepha fraterculus*. Não foram registrados parasitoides associados aos exemplares de *Ceratitis capitata* obtidos dos frutos analisados.

Dessa forma, os resultados demonstraram a ocorrência de duas espécies de Tephritidae associadas aos frutos de *Terminalia catappa* e a presença de *Doryctobracon areolatus* entre os parasitoides emergidos dessas amostras, Como pode ser visualizado na **Tabela 1.**

DISCUSSÃO

A emergência de *Anastrepha fraterculus* e *C. capitata* a partir de frutos de *T. catappa* está de acordo com os registros existentes para o Rio Grande do Norte. Basílio (2026), em levantamento abrangente da diversidade de Tephritidae no estado, registrou *T. catappa* como hospedeiro de diferentes espécies, incluindo *A. fraterculus*, *A. sororcula*, *A. zenildae* e *C. capitata*. O autor também registrou especificamente *A. fraterculus* associada a *T. catappa* na Mata do Forte, além de *C. capitata* associada à mesma planta e localidade.

Portanto, os resultados deste estudo não constituem um novo registro de *Anastrepha fraterculus* ou *C. capitata* em *T. catappa* para a Mata do Forte. Entretanto, os dados obtidos complementam o conhecimento anteriormente produzido ao apresentar a abundância dos adultos emergidos, a distribuição entre os sexos e a associação com parasitoides durante o período específico de amostragem.

A presença de *T. catappa* como hospedeiro de diferentes Tephritidae também é compatível com levantamentos realizados em outras regiões brasileiras. Alvarenga et al. (2009), ao estudarem moscas-das-frutas e parasitoides em municípios do norte de Minas Gerais, encontraram *C. capitata* e diversas espécies de *Anastrepha* associadas a diferentes plantas hospedeiras, além de registrarem *D. areolatus* como um dos principais parasitoides encontrados.

No Rio Grande do Norte, Araujo et al. (2005) também demonstraram a importância da diversidade de plantas hospedeiras para a manutenção das populações de Tephritidae. O estudo, realizado por meio de coletas em frutos e armadilhas na região semiárida do estado, registrou dez espécies de moscas-das-frutas e identificou diferentes plantas hospedeiras. Os autores observaram ainda que os níveis de infestação variavam conforme a espécie de mosca e o hospedeiro disponível (ARAUJO et al., 2005).

Essa relação entre disponibilidade de hospedeiros e ocorrência de Tephritidae é particularmente relevante para a interpretação dos resultados obtidos neste trabalho. Embora *T. catappa* tenha sido o único fruto no qual ocorreu emergência durante o período analisado, não é possível afirmar, com base apenas nesses dados, que as moscas apresentam preferência pela castanhola. A ausência de emergência nos demais frutos pode estar relacionada a fatores como quantidade de frutos disponíveis, estágio de maturação, período de frutificação, condições ambientais, intensidade de infestação ou mesmo ao tamanho da amostra.

A diferença entre os resultados obtidos por coleta de frutos e por armadilhas também demonstra a importância da utilização de métodos complementares. A coleta de frutos permite estabelecer uma associação direta entre a espécie de mosca e seu hospedeiro,

além de possibilitar a obtenção de parasitoides associados às fases imaturas. As armadilhas, por sua vez, permitem registrar a presença de adultos em atividade na área. Araujo et al. (2005) utilizaram justamente esses dois métodos para avaliar as moscas-das-frutas no semiárido do Rio Grande do Norte.

No presente estudo, *Anastrepha fraterculus* apresentou maior número de indivíduos provenientes dos frutos, com 123 exemplares, enquanto *C. capitata* apresentou 107. Nas armadilhas, entretanto, ocorreu o inverso, com 12 indivíduos de *C. capitata* contra seis de A. fraterculus. Essa diferença pode refletir diferenças na atividade dos adultos, na eficiência do método de captura ou na disponibilidade de hospedeiros na área. Assim, os resultados dos dois métodos não devem ser interpretados como medidas diretamente equivalentes de abundância populacional.

Parasitoides

A obtenção de 12 indivíduos de *D. areolatus* associados às amostras de *T. catappa* nas quais ocorreu *Anastrepha fraterculus* é consistente com o conhecimento sobre a relação entre esse parasitoide e espécies do gênero *Anastrepha*. No Rio Grande do Norte, Araujo e Zucchi (2002) registraram três espécies de *Braconidae* associadas a moscas-das-frutas na região de Mossoró/Assu, com predominância de *D. areolatus*, que representou 96,6% dos braconídeos obtidos no estudo.

A associação entre *D. areolatus* e *Anastrepha fraterculus* também foi demonstrada por Nunes et al. (2011), que estudaram experimentalmente o potencial de parasitismo de *D. areolatus* sobre larvas de *Anastrepha fraterculus*. Os autores obtiveram uma taxa média de parasitismo de 53,5%, demonstrando a capacidade do parasitoide de utilizar essa espécie como hospedeiro.

De maneira semelhante, Silva et al. (2011), em levantamento realizado em diferentes municípios da Bahia, registraram *D. areolatus* emergindo de *A. fraterculus*, além de outras espécies de Anastrepha. Os resultados demonstram que a associação entre esse parasitoide e *A. fraterculus* ocorre em diferentes regiões brasileiras, não estando restrita ao Rio Grande do Norte.

Os resultados encontrados também são compatíveis com a síntese apresentada por Araujo e Fernandes (2023), que reúne informações sobre as moscas-das-frutas, suas plantas hospedeiras e parasitoides no Rio Grande do Norte. A obra destaca a diversidade de relações entre Tephritidae, plantas hospedeiras e inimigos naturais no estado. Essa perspectiva é particularmente relevante para o presente estudo, uma vez que a ZPA-07 está inserida em uma área urbana e apresenta vegetação capaz de fornecer recursos para diferentes organismos.

Apesar disso, o número de parasitoides obtidos neste trabalho não permite estabelecer uma taxa de parasitismo para a área. Para isso, seria necessário relacionar o número total de pupários produzidos ao número de indivíduos parasitados. Dessa maneira, os 12 exemplares obtidos devem ser interpretados como evidência da ocorrência da associação entre *D. areolatus* e *A. fraterculus* nas amostras de *T. catappa*, e não como estimativa da intensidade de parasitismo da população.

A ausência de parasitoides associados aos exemplares de *C. capitata* também deve ser interpretada com cautela. Esse resultado pode estar relacionado ao número de amostras analisadas, à disponibilidade de hospedeiros para os parasitoides, às características do fruto ou à própria composição da comunidade de inimigos naturais presente na área. Portanto, não é possível concluir, a partir deste estudo, que *C. capitata* não seja parasitada na ZPA-07.

Relevância para a ZPA-07

A comparação com Basílio (2026) mostra que a Mata do Forte já apresenta registros de *A. fraterculus* e *C. capitata* associados a *T. catappa*, bem como registros dessas espécies em armadilhas McPhail. Assim, o presente estudo deve ser entendido como uma complementação do conhecimento existente sobre a entomofauna da ZPA-07, e não como o primeiro registro dessas espécies na área.

A principal contribuição está na obtenção de dados diretamente provenientes de frutos coletados na área, permitindo relacionar o hospedeiro às espécies emergidas e aos parasitoides associados. A presença simultânea de *T. catappa*, *A. fraterculus* e *D. areolatus* evidencia a ocorrência de uma interação tritrófica na área estudada, enquanto a presença de *C. capitata* demonstra que a mesma planta também pode sustentar uma espécie de Tephritidae de ampla distribuição.

Além disso, os dados reforçam a importância de manter o monitoramento de áreas de conservação inseridas em ambientes urbanos. A continuidade das coletas em diferentes períodos de frutificação poderá ampliar o número de hospedeiros e espécies registradas, permitindo avaliar possíveis variações sazonais e temporais na composição das comunidades de Tephritidae e seus parasitoides. O próprio levantamento de Basílio (2026) aponta a existência de lacunas de conhecimento sobre a distribuição das moscas-das-frutas no Rio Grande do Norte e ressalta a necessidade de monitoramento em áreas e hospedeiros ainda pouco estudados.

Conclusão

O levantamento realizado na ZPA-07 (Mata do Forte), em Natal/RN, permitiu identificar a ocorrência de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em frutos de *Terminalia catappa*, único hospedeiro com emergência de tefritídeos entre os frutos coletados. Foram obtidos 230 adultos dos frutos e 18 em armadilhas, reforçando o papel da castanhola como recurso para essas espécies na área. Registrou-se também a emergência de *Doryctobracon areolatus* associado a *Anastrepha fraterculus*, evidenciando uma interação trófica, embora a amostragem não tenha sido suficiente para estimar taxas de parasitismo. A ausência de emergência em outros frutos e de parasitoides em *Ceratitis capitata* não descarta possíveis associações, sujeitas a fatores ambientais e metodológicos. O estudo reforça a importância de monitoramentos contínuos em áreas urbanas protegidas, como a ZPA-07, para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade local e subsidiar ações de conservação e manejo.

Referências

ARAÚJO, E. L.; ZUCCHI, R. A. Parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) na região de Mossoró/Assu, Estado do Rio Grande do Norte. Arquivos do Instituto Biológico, v. 69, n. 2, p. 65-68, 2002.

ALVARENGA, C. D.; MATRANGOLO, C. A. R.; LOPES, G. N.; SILVA, M. A.; LOPES, E. N.; ALVES, D. A.; NASCIMENTO, A. S.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitóides em plantas hospedeiras de três municípios do norte do Estado de Minas Gerais. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 195-204, 2009. DOI: 10.1590/1808-1657v76p1952009.

ARAÚJO, E. L.; MEDEIROS, M. K. M.; SILVA, V. E.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no semi-árido do Rio Grande do Norte: plantas hospedeiras e índices de infestação. Neotropical Entomology, v. 34, n. 6, p. 889-894, 2005.

ARAÚJO, E. L.; FERNANDES, E. C. Moscas-das-frutas, suas plantas hospedeiras e parasitoides no estado do Rio Grande do Norte. In: ZUCCHI, R. A.; MALAVASI, A.; ADAIME, R.; NAVA, D. E. (org.). Moscas-das-frutas no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Piracicaba: FEALQ, 2023. v. 2, p. 289-298.

BASÍLIO, J. V. N. Chave pictórica ilustrada para identificação de fêmeas de Anastrepha (Diptera: Tephritidae) com ocorrência no Rio Grande do Norte, Brasil. Zenodo, 2025.

BASÍLIO, João Victor Nicacio. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Rio Grande do Norte, Brasil: diversidade, aspectos ecológicos e morfometria. 2026. 203 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2026.

NASCIMENTO, A. S. et al. Monitoramento de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.

NATAL. Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo. Zoneamento ambiental de Natal. Natal: Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo, 2008.

NUNES, A. M.; NAVA, D. E.; MÜLLER, F. A.; GONÇALVES, R. S.; GARCIA, M. S. Biology and parasitic potential of Doryctobracon areolatus on Anastrepha fraterculus larvae. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 46, n. 6, p. 669-671, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000600014.

SILVA, L. N. et al. First survey of fruit fly (Diptera: Tephritidae) and parasitoid diversity among Myrtaceae fruit across the State of Bahia, Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 757-764, 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011000300009.

WIEDEMANN, C. R. W. Anastrepha fraterculus. Catalogue of Life, 1830.

ZUCCHI, R. A.; MALAVASI, A.; ADAIME, R.; NAVA, D. E. (org.). Moscas-das-frutas no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Piracicaba: FEALQ, 2023. ISBN 978-65-89722-59-5.

ZUCCHI, R. A. (ed.). Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 109-112.

Anexos



Tabela 1 – Espécies de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitoides obtidos a partir de frutos coletados na Zona de Proteção Ambiental 07 (ZPA-07), Natal, Rio Grande do Norte, durante o período de setembro de 2025 á agosto de 2026.

CÓDIGO: SB0297

AUTOR: ANDRÉ SANTOS DE AQUINO ALVES DO MONTE

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: RIQUEZA DE HIFOMICETOS AQUÁTICOS NA AMAZÔNIA MATO GROSSENSE, BRASIL

Resumo

Estima-se entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies de fungos, mas apenas cerca de 150 mil são conhecidos. Em regiões tropicais, como a Amazônia, a maior floresta tropical úmida do mundo, os hifomicetos aquáticos, fungos microscópicos, enfrentam ameaças crescentes como as ações antrópicas nos ecossistemas aquáticos. Com um papel central na ciclagem de nutrientes, eles podem ser classificados de acordo com sua reprodução e modo de vida (aero-aquáticos, aquáticos facultativos e ingoldianos). O presente estudo teve como objetivo caracterizar a riqueza desses fungos em substratos vegetais em decomposição em um rio do Parque Estadual do Xingu, Mato Grosso. Foram realizadas cinco expedições entre abril de 2022 e julho de 2025, totalizando 600 substratos. Através da câmara úmida, foram identificados 69 táxons distribuídos em dois filos, cinco classes, 14 ordens, 16 famílias e 44 gêneros. Sordariomycetes foi a classe mais representativa (28), seguida de Dothideomycetes (14). As folhas apresentaram maior riqueza (49) que os galhos (36). A análise de similaridade pelo índice de Jaccard indicou baixa sobreposição entre substratos (23%) e alta estabilidade temporal entre eventos de coleta (86–97%). A quinta coleta registrou menor riqueza (seis), possivelmente devido aos incêndios florestais de 2025. Os resultados reforçam a diversidade e relevância dos hifomicetos aquáticos na Amazônia, destacando a necessidade de estudos para conhecer e conservar esses fungos e seus serviços ecossistêmicos.

Palavras-chave: Câmara-úmida. Decomposição. Floresta tropical. Microfungos assexuais.

TITLE: RICHNESS OF AQUATIC HYPHOMYCETES IN THE AMAZON REGION OF MATO GROSSO, BRAZIL

Abstract

An estimated 2.2 to 3.8 million fungal species exist, but only about 150,000 are known. In tropical regions such as the Amazon, the largest tropical rainforest in the world,

aquatic hyphomycetes face growing threats due to their microscopic condition and anthropogenic impacts on aquatic ecosystems. Playing a central role in nutrient cycling, they can be classified according to their reproduction and lifestyle (aero-aquatic, facultative aquatic, and Ingoldian). This study aimed to characterize the richness of these fungi on decomposing plant substrates in a river within the Xingu State Park, Mato Grosso. Five sampling expeditions were carried out between April 2022 and July 2025, totaling 600 substrates. Using the moist chamber method, 69 taxa distributed across two phyla, five classes, 14 orders, 16 families, and 44 genera were identified. Sordariomycetes was the most representative class (28), followed by Dothideomycetes (14). Leaves showed higher species richness (49) than twigs (36). Similarity analysis using the Jaccard index indicated low overlap between substrates (23%) and high temporal stability across sampling events (86–97%). The fifth sampling recorded lower richness, likely due to the 2025 wildfires. The results reinforce the diversity and relevance of aquatic hyphomycetes in the Amazon, highlighting the need for further studies to understand and conserve these fungi and their ecosystem services.

Keywords: Asexual microfungi. Decomposition. Moist chamber. Tropical forest.

Introdução

A água, essencial para a manutenção da vida e o funcionamento dos ecossistemas, influencia processos biogeoquímicos e ecológicos em múltiplas escalas (Aylward et al. 2005; Grossart et al. 2019). Em ambientes florestais, a matéria orgânica (folhas e galhos) em vários estágios de decomposição frequentemente se acumula em sistemas aquáticos lênticos (lagos e lagoas) e lóticos (rios e riachos) (Gimenes et al. 2010; Wu et al. 2019). Nesses ambientes, a decomposição de substratos alóctones é essencial para sustentar as teias alimentares aquáticas, processo esse amplamente impulsionado por fungos, fundamentais para manter o equilíbrio ecossistêmico (Bärlocher 2016). Estimativas atuais apontam a existência de 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos no planeta, porém pouco mais de 150 mil são conhecidas até o momento, o que evidencia uma grande lacuna no conhecimento taxonômico do reino Fungi (Hawksworth & Lücking, 2017; Hyde et al. 2024). Dentro disso, destacam-se os microfungos, um grupo altamente diverso, especialmente nas regiões tropicais (Rossman 1997). Entretanto, devido ao seu tamanho microscópico, ainda são pouco estudados e frequentemente subamostrados (Maia et al. 2015), sobretudo em ecossistemas aquáticos (Killeen 2007). Diversos grupos de fungos são encontrados em ambientes aquáticos, dependendo da água para completar uma ou mais etapas de seu ciclo de vida (Tsui et al. 2016). Entre eles, os hifomicetos aquáticos são os mais frequentes e os principais decompositores de matéria orgânica nesses ambientes (Grossart et al. 2019; Franco-Duarte et al. 2022), quebrando moléculas complexas e melhorando a palatabilidade dos nutrientes para outros decompositores (Gulis & Bärlocher 2017a; 2017b; Canto et al. 2022; Tennakoon et al. 2021).

Abrigando às fases assexuadas de Ascomycota e Basidiomycota, a ampla diversidade morfológica dos hifomicetos aquáticos está distribuída em três principais grupos ecológicos: Aero-aquáticos (que possuem morfologia clatrada ou helicoidal, adaptada para reter ar, e desenvolvem seu micélio abaixo da água e esporulam no ar (Fisher 1977; Fisher & Petrini 1991; Yamaguchi et al. 2023)); Aquáticos facultativos (com conídios diversos, geralmente dematiáceos com capacidade de esporular tanto em ambientes

aquáticos quanto terrestres (Goh 1997), e ingoldianos (que esporulam na água e possuem adaptações como conídios hidrodinâmicos, ramificados ou sigmóides, que facilitam a dispersão e a adesão a variados substratos, incluindo espuma, folhas e galhos (Goh & Hyde 1996; Shearer et al. 2007)).

Na Amazônia, a diversidade desses fungos tem sido investigada em suas porções Ocidental, Oriental e Meridional, contabilizando 263 espécies catalogadas (Krause 2021). Embora diversos registros tenham sido publicados para a região, grande parte do bioma permanece subamostrada, ignorando o elevado potencial para a descoberta de novas espécies ao considerar as diferentes áreas de endemismo presente na região (Killeen 2007).

Além disso, extensas áreas do bioma vêm sendo severamente afetadas por ações antrópicas, desmatamento, queimadas, assoreamento dos corpos d'água, extração mineral e expansão agrícola (Ferreira et al. 2005; MapBiomas 2025) que provocam desequilíbrios ecológicos (Salati et al. 2006) e colocam em risco a biodiversidade local e os próprios hifomicetos aquáticos (Solé et al. 2008). Assim, o presente estudo teve como objetivo inventariar os hifomicetos aquáticos decompositores de substratos vegetais (folhas e galhos) em um rio localizado no Parque Estadual do Xingu (PEX), no estado do Mato Grosso (Amazônia Meridional), avaliando e comparando a riqueza, diversidade e similaridade entre coletas e substratos, por meio de análises taxonômicas e ecológicas ao longo de diferentes estações climáticas.

Metodologia

Área de estudo e amostragem: O estudo foi realizado no Parque Estadual do Xingu (PEX), localizado no município de Santa Cruz do Xingu, estado de Mato Grosso, Brasil. O PEX faz parte do Mosaico da Terra do Meio e engloba aproximadamente 95.024 hectares de áreas protegidas caracterizadas por uma alta heterogeneidade ambiental (Córdova et al. 2021). A região está situada em uma zona de contato entre os biomas Amazônia e Cerrado, formando um ecótono de alta complexidade ecológica com marcadas transições florísticas (Figura 1).

O clima predominante é o tropical Aw, com inverno seco e uma estação chuvosa concentrada entre Outubro e Abril. As temperaturas médias anuais variam de 24 °C a 26 °C, enquanto a precipitação anual varia de acordo com os padrões sazonais típicos da região (Alvares et al. 2013). A paisagem do parque compreende mosaicos de Floresta Ombrófila Aberta Submontana, Floresta Ombrófila Densa Aluvial, Campinarana, Savana/Cerrado, afloramentos rochosos e areníticos, bem como áreas sazonalmente alagadas, várzeas e áreas úmidas (Córdova et al. 2021).

Foram realizadas cinco expedições de coleta: C1 = abril de 2022; C2 = agosto de 2023; C3 = abril de 2024; C4 = setembro de 2024; C5 = julho de 2025, no Rio Xingu. Em cada expedição, foram estabelecidos seis pontos de amostragem ao longo do curso do rio, espaçados por 200 metros, formando um gradiente espacial representativo da micro-hidrologia local. Em cada ponto, foram coletadas 10 folhas e 10 galhos (20 unidades de substrato por ponto). Cada expedição rendeu 120 unidades de substrato, resultando em um total de 600 substratos coletados ao longo do estudo (Figura 2).

Processamento das amostras: Os substratos coletados foram armazenados em sacos plásticos, colocados em caixas térmicas com gelo e transportados para o Laboratório de Microscopia da Coleção Biológica da Amazônia Meridional para triagem inicial e preparação para envio ao Laboratório de Biologia de Micorrizas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). No laboratório, as amostras foram processadas seguindo a metodologia de câmara úmida proposta por Castañeda-Ruiz (2016).
O procedimento consistiu na lavagem dos substratos em água corrente por 30 minutos, seguida de armazenamento em câmaras úmidas e observação após 72 horas. Com o auxílio de estereomicroscópios, espécimes selecionados foram montados em lâminas permanentes utilizando meio PVL (álcool polivinílico + ácido lático + fenol), com a secagem/cura das lâminas realizada ao longo de aproximadamente 30 dias. Posteriormente, os espécimes fúngicos foram identificados em microscópio Olympus BX 43 e literatura especializada (Matsushima 1975, 1993; Seifert & Gams 2011; Fiuza et al. 2017) (Figura 3).

Análises ecológicas: Para as análises ecológicas, todos os fungos identificados foram organizados em uma planilha considerando cada tipo de substrato e cada evento de amostragem. A riqueza de espécies foi calculada a partir do número de táxons registrados por substrato e por evento de amostragem, utilizando a função *"specnumber"* do pacote vegan. A similaridade da comunidade foi avaliada pelo índice de Jaccard por meio da função *"vegdist"* (pacote vegan), com o objetivo de identificar diferenças na composição da comunidade entre os tipos de substrato.
Uma análise de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) também foi realizada utilizando dados de presença-ausência dos táxons para cada amostragem, a fim de visualizar os padrões de similaridade entre os grupos em cada evento de amostragem. A similaridade também foi avaliada pelo índice de Jaccard. Todas as análises foram conduzidas no *software* R versão 4.4.3.

Resultados e Discussões

Um total de 69 táxons de hifomicetos aquáticos foi registrado a partir dos substratos submersos ao longo dos cinco eventos de amostragem, distribuídos em dois filos, cinco classes, 14 ordens, 16 famílias e 44 gêneros (Tabela 1; Figura 4). A maior riqueza de táxons foi registrada na classe Sordariomycetes (28 táxons compreendendo sete ordens, sete famílias e 17 gêneros) que representa a segunda maior classe do filo Ascomycota (Wijayawardene et al. 2024) e é comumente encontrada decompondo substratos submersos ou terrestres. Esta foi seguida por Dothideomycetes (14 táxons distribuídos em quatro ordens, cinco famílias e sete gêneros). Em consonância com os achados deste estudo, as classes Dothideomycetes e Sordariomycetes, que são as mais representativas, também têm sido relatadas em outros estudos como classes mais frequentes e diversas, associadas à decomposição de material vegetal, tanto em ambientes submersos quanto terrestre (Dong et al. 2020).
Estudos anteriores também documentaram a ocorrência de Leotiomycetes em ambientes aquáticos, reforçando a afinidade dessa classe com os hifomicetos aquáticos (Baschien et al. 2013). Enquanto um único táxon de Agaricomycetes, *Sistotrema hamatum* Nawawi & J. Webster foi registrado para o filo Basidiomycota. Esse único representante de Basidiomycota neste estudo, segue padrões observados em outros trabalhos que

empregaram a técnica de câmara úmida (Barbosa et al. 2013; Silva et al. 2014; Monteiro 2014; Fiuza et al. 2019; Krause 2021). Essa espécie é frequentemente encontrada em levantamentos de fungos aquáticos (Fiuza et al. 2017), devido à sua tolerância ecológica e potencial saprofítico.

Algumas das espécies identificadas já haviam sido registradas em estudos anteriores que demonstraram a alta diversidade de hifomicetos na Amazônia, particularmente em ambientes aquáticos. Por exemplo, Krause (2021) relatou espécies como *Beltrania rhombica* Penz.; S. hamatum D.E. Shaw; *Thozetella cubensis* R.F. Castañeda & G.R.W. Arnold; *T. cristata* Piroz. & Hodges; X.M.S. Oliveira, Malosso & R.F. Castañeda; *Xylomyces foliicola* W.B. Kendr. & R.F. Castañeda; e *X. giganteus* Goh, W.H. Ho, K.D. Hyde & C.K.M. Tsui, mostrando que essas espécies podem ter ampla distribuição na Amazônia.

Vinte e um táxons não puderam ser classificados ao nível de classe e, portanto, foram atribuídos a incertae sedis. Esse número aumentou nos níveis de ordem (25 táxons) e família (30 táxons). As ordens mais representativas foram Chaetosphaeriales (13 táxons), Jahnulales (cinco), Helotiales (quatro), Pleosporales (quatro) e Xylariales (quatro). A maioria dos táxons de hifomicetos aquáticos esteve distribuída entre as famílias Chaetosphaeriaceae (13 táxons), Aliquandostipitaceae (cinco) e Beltraniaceae (quatro) (Figura 5). Isso destaca lacunas taxonômicas existentes e sublinha a necessidade de estudos adicionais, particularmente com abordagens filogenéticas e moleculares, para ajudar a resolver os desafios sistemáticos que envolvem os hifomicetos aquáticos na Amazônia.

Entre os eventos de amostragem, a coleta C2 exibiu a maior riqueza de espécies (29 táxons), seguida pelas coletas C3 (23) e C1 (20), respectivamente (Figura 6A). As quatro primeiras amostragens (C1–C4) apresentaram riqueza relativamente alta e comunidades com elevada similaridade entre si, conforme indicado pelos valores do índice de Jaccard (0,86–0,97) e pela formação de dois agrupamentos principais no UPGMA: C1–C2 e C3–C4. Isso sugere estabilidade e pouca variação sazonal marcada na composição da comunidade, apesar das diferenças climáticas entre os períodos seco e chuvoso. A quinta amostragem (C5) destaca-se dos agrupamentos observados, apresentando menor riqueza (apenas 6 táxons) e posicionando-se de forma isolada no dendrograma, embora ainda relativamente próxima de C3–C4.

A acentuada redução na riqueza e na composição de táxons observada em C5 pode estar associada aos incêndios florestais que afetaram a Amazônia no final de 2024 e início de 2025. Segundo dados do MapBiomas (2025), durante o período correspondente à quinta amostragem, a Amazônia foi o bioma com a maior área queimada no país, totalizando 774,5 mil hectares, o que representa cerca de 84% de todas as áreas queimadas no Brasil durante o primeiro trimestre. Considerando especificamente o mês de amostragem (julho), o monitoramento detectou que aproximadamente 528.446 hectares do bioma já haviam sido afetados pelo fogo ao longo do ano de 2024, evidenciando um cenário de incêndios atípicos e intensos que geraram severos impactos ambientais em escala regional (MapBiomas 2025).

A intensidade desses eventos pode influenciar diretamente o funcionamento das comunidades de hifomicetos aquáticos, especialmente porque incêndios florestais em grande escala são conhecidos por causar profundas alterações na qualidade da água e no aporte de matéria orgânica, devido à sua sensibilidade (Rajashekhar & Kaveriappa 2000; Solé et al. 2008; Medeiros et al. 2009; Kominoski et al. 2015; Fiuza et al. 2019). Estudos mostram que incêndios florestais aumentam a deposição de cinzas e sedimentos finos nos corpos d'água, elevam a turbidez, modificam o pH, aumentam a concentração de íons dissolvidos e metais e alteram os regimes térmico e hidráulico dos sistemas

aquáticos (EPA 2024). Essas mudanças físico-químicas, isoladas ou combinadas, podem comprometer a colonização do substrato, a esporulação e a atividade decompositora de fungos como os hifomicetos aquáticos (Seena & Barros 2022).

No presente estudo, apenas três táxons previamente registrados foram reencontrados em C5: *Beltrania rhombica* Penz.; *Xylomyces aquaticus* (Dudka) K.D. Hyde & Goh; e *X. foliicola* W.B. Kendr. & R.F. Castañeda. Essa variação na comunidade pode refletir os diferentes requisitos ecológicos e funcionais entre os táxons de hifomicetos aquáticos, tais como preferências de substrato, variações na resposta aos fatores físico-químicos da água e diferenças na capacidade de colonizar e esporular sob condições ambientais distintas (Solé et al. 2008; Medeiros et al. 2009; Kominoski et al. 2015; Barreto et al. 2023).

Em relação aos substratos, a riqueza de espécies foi maior em folhas (49 táxons) do que em galhos (36), com 33 táxons exclusivos de folhas, 20 exclusivos de galhos em decomposição e 16 táxons compartilhados entre ambos os substratos (Figura 6B). A análise do índice de Jaccard reforça essa distinção entre os substratos. O baixo valor de similaridade observado (0,23) indica que apenas cerca de 23% das espécies são compartilhadas entre folhas e galhos, enquanto aproximadamente 77% ocorrem exclusivamente em um dos dois substratos. Isso sugere que cada substrato abriga comunidades fúngicas distintas. Assim, folhas e galhos funcionam como microhabitats diferentes, com características próprias que influenciam a composição das espécies. Diversos estudos anteriores demonstraram que a especificidade dos fungos ao substrato está diretamente ligada ao seu repertório de enzimas, seja voltado para a degradação de lignina, celulose ou ambas (Gulis 2001; Santa-Izabel & Gusmão 2018). As folhas representam substratos mais facilmente degradáveis por conterem maiores concentrações de celulose, serem ricas em nutrientes e oferecerem uma maior área de superfície em contato com a água, promovendo assim a colonização por um número maior de espécies fúngicas (Bärlocher 2016; Gulis & Bärlocher 2017a; 2017b). Os galhos, por outro lado, são mais duros, mais lignificados e de decomposição mais lenta, tendendo a selecionar um conjunto menor, e mais especializado, de espécies (Gulis 2001; Graça et al. 2016; Santa-Izabel & Gusmão 2018).

Considerando os grupos ecológicos, quatro táxons eram fungos aero-aquáticos, 58 aquáticos facultativos e sete fungos ingoldianos (Figura 6C). O maior número de táxons aquáticos facultativos pode ser decorrente da técnica de câmara úmida, que tende a favorecer fungos capazes de esporular tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres (Castañeda-Ruiz et al. 2016; Fiuza et al. 2019). Isso ocorre porque táxons aero-aquáticos e ingoldianos exigem que pelo menos parte do seu ciclo de vida esteja submersa na água, reduzindo a competição por habitat e recursos com os fungos aquáticos facultativos durante a incubação em câmara úmida (Goh & Hyde 1996; Goh 1997; Yamaguchi et al. 2023). Contudo, os fungos aero-aquáticos, que foram menos representativos, podem ter sido desfavorecidos pelo tipo de ambiente onde os substratos foram coletados, uma vez que se desenvolvem melhor em ambientes lênticos (águas de baixo fluxo), crescendo vegetativamente em substratos submersos e esporulando quando em contato com o ar na superfície da água (Yamaguchi et al. 2023).

Essa mudança na comunidade também destaca a necessidade de políticas de conservação que incluam os hifomicetos aquáticos, dado que sua importância ecológica nos ecossistemas aquáticos é amplamente reconhecida. Apesar desse papel fundamental, eles permanecem quase totalmente negligenciados nas estratégias de conservação, que tipicamente priorizam plantas, animais e macrofungos mais conspícuos (Seena & Barros 2022). Embora já exista um grupo de especialistas em conservação fúngica no Brasil

(*IUCN SSC Brazil Fungal Specialist Group*), microfungos como os hifomicetos aquáticos ainda são negligenciados nas políticas públicas de conservação.

Conclusão

A Amazônia apresenta elevado potencial de biodiversidade e endemismo para novas descobertas micológicas. Os resultados deste estudo evidenciam uma alta riqueza de espécies de hifomicetos aquáticos na região, corroborando pesquisas anteriores e revelando espécies raras, pouco conhecidas e táxons potencialmente novos para a ciência. Esse cenário ressalta a relevância do bioma e evidencia como os microfungos aquáticos permanecem subamostrados.

Embora os dados obtidos ampliem o conhecimento sobre o grupo, investigações contínuas e abrangentes são indispensáveis para aprofundar o entendimento sobre diversidade, ecologia e dinâmica dessas comunidades assexuadas, cuja pesquisa permanece incipiente. A identificação de espécies ainda não descritas reforça o valor biológico da região e reafirma o papel essencial desses decompositores na manutenção dos fluxos de carbono e na sustentação das cadeias tróficas.

Diante das crescentes ameaças ambientais, como o avanço de queimadas e pressões antrópicas, torna-se urgente a formulação de ações efetivas de conservação e políticas públicas que contemplem os hifomicetos aquáticos. Integrar esses bioindicadores nas estratégias de proteção é fundamental para assegurar a manutenção dos serviços ecossistêmicos essenciais. Por fim, os dados aqui apresentados constituem uma base sólida para orientar futuras pesquisas e fortalecer a preservação dos ecossistemas aquáticos amazônicos. Esses estudos também podem subsidiar avanços na fitopatologia, biotecnologia e na formulação de políticas públicas voltadas à conservação desse bioma tão complexo e vulnerável.

Referências

Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., de Moraes, G. J., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, 22(6), 711–728.

Aylward, B., Bandyopadhyay, J., Belausteguigoitia, J. C., Borsch, P., Biswas, A. K., Chiramba, T., Chocair, G., Dunsby, J., & Gong, G. (2005). Freshwater ecosystem services. In Millennium Ecosystem Assessment: Ecosystems and Human Well-being: Policy Responses (Vol. 3, pp. 213–255). Island Press.

Barbosa, F. R., Silva, S. S., Fiuza, P. O., & Gusmão, L. F. P. (2013). Some freshwater fungi from the Brazilian semi-arid region, including two new species of hyphomycetes. Cryptogamie, Mycologie, 34(3), 243–258.

Bärlocher, F. (2016). Aquatic hyphomycetes. In J. Dighton & J. F. White (Eds.), The fungal community: Its organization and role in the ecosystem (4th ed., pp. 439–454).

CRC Press.
Baschien, C., Tsui, C. K. M., Stackebrandt, E., & Marvanová, L. (2013). The molecular phylogeny of aquatic hyphomycetes with affinity to the Leotiomycetes. Fungal Biology, 117(9), 660–672.
Canto, E. S. M., Silva, T. A., & Oliveira, A. B. (2022). Freshwater fungi in the Amazon as a potential source of antimicrobials. In Freshwater Mycology (pp. 261–275). Academic Press.
Castañeda-Ruiz, R. F., Heredia, G., Gusmão, L. F. P., & Li, D. W. (2016). Fungal diversity of Central and South America. In D. W. Li (Ed.), Biology of microfungi (pp. 197–217). Springer.
Córdova, M. O., Pires, E. M., & Santos, R. M. (2021). A vegetação do PEX. In E. M. Pires (Ed.), Vegetação e plantas do Parque Estadual do Xingu (pp. 21–67). Unisselva.
Dong, W., Wang, B., Hyde, K. D., McKenzie, E. H. C., Raja, H. A., Tanaka, K., Abdel-Wahab, M. A., Abdel-Aziz, F. A., Doilom, M., Phookamsak, R., Jangdeproam, J., Suetrong, S., Cai, L., Zhang, H., & Boonmee, S. (2020). Freshwater Dothideomycetes. Fungal Diversity, 105(1), 319–575.
Environmental Protection Agency. (2024). Climate change indicators in the United States (5th ed., EPA Publication No. 430-R-24-003). U.S. Environmental Protection Agency.
Ferreira, L. V., Venticinque, E., & Almeida, S. (2005). O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. Estudos Avançados, 19(53), 157–166.
Fisher, P. J., Petrini, O., & Webster, J. (1991). Aquatic hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots of Alnus glutinosa. Mycological Research, 95(5), 543–547.
Fiuza, P. O., Santos, T. A., & Gusmão, L. F. P. (2017). Ingoldian fungi of Brazil: Some new records and a review including a checklist and a key. Phytotaxa, 306(3), 171–200.
Fiuza, P. O., Silva, S. S., & Gusmão, L. F. P. (2019). Diversity of freshwater hyphomycetes associated with leaf litter of Calophyllum brasiliense in streams of the semiarid region of Brazil. Mycological Progress, 18(7), 907–920.
Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bezerra, C. F., Martins, N., Rodrigues, C. F., Lima, N., & Pais, C. (2022). The role of fungi in freshwater ecosystems. Fungal Biology Reviews, 38, 1–15.
Goh, T. K., & Hyde, K. D. (1996). Biodiversity of freshwater fungi. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 17(5–6), 328–345.
Goh, T. K., Hyde, K. D., Ho, W. H., & Yanna. (1997). Four new species of Xylomyces from submerged wood. Mycological Research, 101(11), 1323–1328.
Grossart, H. P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., & Rojas-Jimenez, K. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. Nature Reviews Microbiology, 17(6), 339–354.
Gulis, V. (2001). Are there any substrate preferences in aquatic hyphomycetes? Mycological Research, 105(9), 1088–1093.
Gulis, V., & Bärlocher, F. (2017a). Fungi: Biomass, production and community structure. In F. R. Hauer & G. A. Lamberti (Eds.), Methods in stream ecology (3rd ed., Vol. 1, pp. 177–192). Academic Press.
Gulis, V., & Bärlocher, F. (2017b). Fungi in aquatic ecosystems. Biodiversity and Conservation, 26(11), 2613–2633.
Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiology Spectrum, 5(4), 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016.
Killeen, T. J. (2007). A perfect storm in the Amazon wilderness. Advances in Applied Biodiversity Science, 7, 1–102.

Kominoski, J. S., Rosemond, A. D., Benstead, J. P., Gulis, V., Maerz, J. C., & Manning, D. W. P. (2015). Low-to-moderate nitrogen and phosphorus concentrations accelerate microbially driven litter breakdown rates. Ecological Applications, 25(3), 856–865.
Krause, L. M. (2021). Hifomicetos associados a substratos vegetais submersos no Sul da Amazônia, Mato Grosso, Brasil (Dissertação de mestrado). Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta.
Maia, L. C., de Carvalho Júnior, A. A., Cavalcanti, L. D. H., Gugliotta, A. D. M., Drechsler-Santos, E. R., Santiago, A. L. C. M. D. A., Cáceres, M. E. S., Gibertoni, T. B., Aptroot, A., Giachini, A. J., Soares, A. M. S., Silva, A. C. G., Magnago, A. C., Goto, B. T., Lira, C. R. S., Montoya, L., Pires, R. M., Silva-Filho, A. G. S., … Leonardi, M. (2015). Diversity of Brazilian fungi. Rodriguésia, 66(4), 1033–1045.
MapBiomas. (2025). Projeto MapBiomas – Monitor do fogo. https://plataforma.monitorfogo.mapbiomas.org/
Matsushima, T. (1975). Icones microfungorum a Matsushima lectorum. Published by the author.
Matsushima, T. (1993). Matsushima mycological memoirs (No. 7). Published by the author.
Medeiros, A. O., Pascoal, C., & Graça, M. A. S. (2009). Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. Freshwater Biology, 54(1), 142–149.
Monteiro, J. S. (2009). Hifomicetos associados a palmeiras na Floresta Nacional de Caxiuanã (Tese de doutorado). Universidade Federal do Pará, Belém.
Rajashekhar, M., & Kaveriappa, K. M. (2000). Effects of temperature and light on growth and sporulation of aquatic hyphomycetes. Hydrobiologia, 441(1), 149–153.
Rossman, A. Y., & Farr, D. F. (1997). Towards a virtual reality for plant-associated fungi in the United States and Canada. Biodiversity & Conservation, 6(5), 739–751.
Salati, E., Santos, Â. A. dos, & Klabin, I. (2006). Temas ambientais relevantes. Estudos Avançados, 20(56), 107–127.
Santa Izabel, T. S., & Gusmão, L. F. P. (2018). Richness and diversity of conidial fungi in Atlantic Forest enclaves in the Caatinga. Acta Botanica Brasilica, 32(1), 32–39.
Seena, S., & Barros, J. (2022). Fungi in freshwaters: Prioritising aquatic hyphomycetes in conservation goals. Water, 14(4), Article 605.
Seifert, K. A., & Gams, W. (2011). The genera of Hyphomycetes – 2011 update. Persoonia, 27(1), 119–129.
Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Raja, H. A., Miller, A. N., Price, H. A., Bodman, L., & Marvanová, L. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodiversity and Conservation, 16(1), 49–67.
Silva, S. S., Izabel, T. S. S., & Gusmão, L. F. P. (2014). Fungos conidiais associados a substratos vegetais submersos no bioma Caatinga. Rodriguésia, 65(2), 527–538.
Solé, M., Fetzer, I., Wennrich, R., Sridhar, K. R., Harms, H., & Krauss, G. J. (2008). Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for anthropogenic stress. Science of the Total Environment, 389(2–3), 557–565.
Tennakoon, D. S., Kuo, C. H., Maharachchikumbura, S. S. N., Thambugala, K. M., Gentekaki, E., Phillips, A. J. L., Bhat, D. J., Wanasinghe, D. N., de Silva, N. I., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Taxonomic and phylogenetic contributions to microfungi inhabiting leaf litter. Fungal Diversity, 108(1), 1–215.
Tsui, C. K. M., Hyde, K. D., & Hodgkiss, I. J. (2016). Biodiversity of freshwater fungi. Fungal Ecology, 6, 544–545.
Wu, Y., Zhu, K., Zhang, J., Müller, M., Jiang, S., Mujahid, A., & Sia, E. S. A. (2019). Distribution and degradation of terrestrial organic matter in the sediments of peat-draining rivers, Sarawak, Malaysian Borneo. Biogeosciences, 16(22), 4517–4533.

Yamaguchi, K. (2023). Recent studies on aero-aquatic fungi, with special reference to diversity of conidial morphology and convergent evolution. Mycoscience, 64(5), 128

CÓDIGO: SB0299

AUTOR: RODRIGO OLIMPIO ORVATE ARRUDA

COAUTOR: JOHSEPH PABALLO GOMES DE SOUZA

COAUTOR: LUCAS DENYLSON RIBEIRO FARIAS SANTOS

COAUTOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

ORIENTADOR: JANINE INEZ ROSSATO

TÍTULO: Impacto da infusão de nociceptina na atividade eletrofisiológica hipocampal

Resumo

Os ritmos cerebrais refletem a atividade síncrona de redes neurais e são fundamentais para processos cognitivos. No hipocampo, oscilações nas bandas teta, gama e delta coordenam a codificação e evocação de memórias. A nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) é um peptídeo endógeno que modula negativamente o processamento de memórias ao se ligar ao receptor NOP (receptor inibitório acoplado à proteína G). No entanto, o impacto dessa modulação sobre a atividade oscilatória hipocampal em tempo real permanece pouco compreendido. Este estudo investigou como a atividade dos receptores NOP hipocampais influencia as oscilações neurais. Ratos Wistar foram submetidos a cirurgia para implante de matrizes de microeletrodos e cânulas de infusão na área CA1 do hipocampo dorsal. Após recuperação, os animais receberam infusões locais de nociceptina ou veículo. Registros de potencial de campo local (LFP) foram realizados antes e por até 120 minutos após as infusões. Os resultados mostram que a ativação dos receptores NOP em CA1 induz supressão acentuada e sustentada da potência das bandas teta e delta, associada a redução da potência de banda larga do LFP, enquanto as sub-bandas gama (slow, mid e fast) permaneceram amplamente inalteradas. Concluímos que a sinalização do receptor NOP atenua de forma ampla a atividade hipocampal de baixa frequência, em vez de promover realocação seletiva de teta para delta, fornecendo um mecanismo de rede para seus efeitos amnésicos.

Palavras-chave: Hipocampo. Nociceptina. Receptores NOP. Oscilações neurais.

TITLE: Impact of nociceptin infusion on hippocampal electrophysiological activity

Abstract

Brain rhythms reflect the synchronous activity of neural networks and are fundamental to cognitive processes. In the hippocampus, oscillations in the theta, gamma, and delta bands coordinate the encoding and retrieval of memories. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is an endogenous peptide that negatively modulates memory processing by binding to the NOP receptor (an inhibitory G protein-coupled receptor). However, the impact of this modulation on hippocampal oscillatory activity in real time remains poorly understood. This study investigated how hippocampal NOP receptor activity influences neural oscillations. Wistar rats underwent surgery for implantation of microelectrode arrays and infusion cannulas in the CA1 area of the dorsal hippocampus. After recovery, animals received local infusions of nociceptin or vehicle. Local field potential (LFP) recordings were performed before and for up to 120 minutes after the infusions. Results show that activation of NOP receptors in CA1 induces a marked and sustained suppression of theta and delta band power, associated with a reduction in broadband LFP power, while gamma sub-bands (slow, mid, and fast) remained largely unchanged. We conclude that NOP receptor signaling broadly attenuates low-frequency hippocampal activity, rather than promoting a selective shift from theta to delta, providing a network-level mechanism for its amnesic effects.

Keywords: Hippocampus; Nociceptin; NOP receptor; Neural oscillations.

Introdução

A memória depende da capacidade do cérebro de processar e armazenar informações por meio da atividade coordenada de circuitos neurais. No hipocampo, estrutura fundamental para a consolidação de memórias declarativas, essa coordenação se manifesta na forma de oscilações elétricas que refletem a atividade síncrona de populações neuronais (Buzsáki, 2006). As oscilações hipocampais são classificadas em bandas de frequência, destacando-se as faixas teta (4-8 Hz), gama (30-100 Hz) e delta (1-4 Hz). O ritmo teta é gerado por um sistema septo-hipocampal ascendente que atua como temporizador global durante a exploração e o aprendizado (Vertes & Kocsis, 1997), enquanto o ritmo gama emerge de redes de interneurônios inibitórios e reflete o processamento de assembleias neuronais locais (Buzsáki, 2015; Lisman & Jensen, 2013; Bartos, Vida & Jonas, 2007). A interação entre essas bandas, conhecida como acoplamento teta-gama, é considerada um mecanismo neural vital para a codificação e evocação mnemônica (Jensen & Colgin, 2007).

O processamento oscilatório é finamente regulado por sistemas neuromodulatórios e neuropeptídicos. Entre estes, destaca-se a nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ), um neuropeptídeo endógeno de 17 aminoácidos (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). A nociceptina se liga seletivamente ao receptor NOP (anteriormente denominado ORL1), um receptor acoplado à proteína G do tipo Gi/o (Wu et al., 1997). A ativação dos receptores NOP desencadeia a inibição da adenilato ciclase, o bloqueio de canais de Ca2+ voltagem-dependentes e o aumento da condutância de canais de K+ do tipo retificadores internos (Connor et al., 1996; Vaughan & Christie, 1996). O efeito líquido dessa cascata celular é fortemente inibitório, resultando na hiperpolarização neuronal e na redução da liberação de neurotransmissores (Heinricher, 2003; Schlicker & Morari, 2000), incluindo a inibição direta da transmissão sináptica excitatória e da potenciação de longa duração no hipocampo (Yu & Xie, 1998).

O sistema N/OFQ-NOP apresenta ampla distribuição no sistema nervoso central, com densa expressão na área CA1 do hipocampo (Mollereau & Mouledous, 2000; Neal et al., 1999). Estudos comportamentais demonstram que agonistas NOP modulam negativamente o aprendizado e a memória (Hajós et al., 2013; Meis et al., 2002, Ribeiro et al., 2026), além de promoverem estados ansiolíticos, sedativos e de sono lento (Morairty et al., 2023; Whiteside et al., 2024). No entanto, o impacto funcional da ativação do receptor NOP sobre a atividade oscilatória do hipocampo in vivo permanece uma lacuna de conhecimento. Considerando que a atividade oscilatória de rede emerge do equilíbrio excitatório-inibitório e da propriedade de disparo síncrono, é plausível que a inibição neuronal promovida pela nociceptina afete diretamente a geração e a manutenção dos ritmos teta e gama. Investigar essa relação é fundamental para compreender os mecanismos fisiológicos pelos quais a nociceptina altera o processamento cognitivo e a dinâmica de rede no hipocampo.

Metodologia

Animais experimentais e condições de manutenção

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar. Os animais foram mantidos no Laboratório de Estudos de Memória do Instituto do Cérebro (ICe/UFRN) sob condições controladas de temperatura (21°C), ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso ad libitum a água e ração. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (Certificado 354.038-2023) e atendeu aos preceitos da Lei AROUCA (Lei 11.794/2008).

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução de 2-5% e manutenção de 0,5-2% em O2) e posicionados em um aparelho estereotáxico. Uma matriz composta por 32 microeletrodos de tungstênio (35 µm) acoplada a cânulas de aço inoxidável (0,2 mm de calibre) foi implantada na camada piramidal da área CA1 do hipocampo dorsal nas seguintes coordenadas estereotáxicas: AP -4,2 mm, ML ±2,4 mm, DV -3,0 mm a partir do bregma (Paxinos & Watson, 2006). Parafusos de fixação mecânica e um parafuso de aterramento foram inseridos no crânio. Após a cirurgia, os animais receberam meloxicam (2 mg/kg, s.c.) por três dias e foram alojados individualmente, com período de recuperação pós-operatória de 7 a 10 dias antes dos registros.

Registro eletrofisiológico e infusão

Os sinais elétricos neurais foram adquiridos através do sistema CerePlex Direct (Blackrock Microsystems, Utah, EUA). Os sinais de potencial de campo local (LFP) foram amostrados a 30 kHz e filtrados na faixa passa-banda de 0,3 a 500 Hz. O protocolo de registro incluiu um período de linha de base (basal) de 15 minutos antes da infusão e registros contínuos por até 120 minutos pós-infusão, permitindo monitorar a evolução temporal dos efeitos da droga. As infusões locais foram realizadas via cânula guia acoplada à matriz, sendo utilizados dois grupos experimentais: Grupo Veículo

(solução salina estéril) e Grupo Nociceptina (N/OFQ). As microinjeções foram realizadas utilizando bombas de microinfusão a uma taxa controlada de 0,5 µl/min (volume total de 1 µl), e os infusores permaneceram no local por 1 minuto adicional para prevenir refluxo. A confirmação histológica do posicionamento da cânula e dos eletrodos foi realizada post-mortem.

Análise dos dados e estatística

A análise computacional dos dados eletrofisiológicos foi conduzida offline utilizando rotinas customizadas em linguagem MATLAB. A densidade espectral de potência (PSD) foi calculada pelo método do periodograma de Welch (janelas de Hamming de 3 segundos com 75% de sobreposição). A potência relativa foi integrada nas seguintes bandas de frequência: Delta (1-4 Hz), Teta (4-8 Hz), slow gamma (30-55 Hz), mid-gamma (55-85 Hz) e fast-gamma (85-120 Hz), além da potência de banda larga (full range, 1-120 Hz), utilizada como medida agregada da atividade oscilatória total. A variação temporal da potência em relação ao basal foi quantificada em janelas discretas de 5 minutos ao longo dos primeiros 30 minutos pós-infusão, e em janelas adicionais de 60-65 e 120-125 minutos, permitindo avaliar tanto os efeitos agudos quanto a persistência da modulação ao longo do registro de 120 minutos. A análise estatística foi executada nos softwares GraphPad Prism e MATLAB. A comparação temporal e entre grupos (Veículo vs. Nociceptina) foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, com o fator tempo tratado como medida repetida, seguida do teste post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas entre grupos em cada ponto temporal. O nível de significância estatística adotado foi de $p = 0,05$.

Resultados e Discussões

A infusão intra-hipocampal de nociceptina na área CA1 de ratos Wistar promoveu uma reconfiguração significativa e seletiva por frequência do perfil espectral do potencial de campo local (LFP), caracterizada por uma supressão robusta nas bandas de baixa frequência (delta e teta) e por um impacto discreto ou ausente sobre as bandas gama, conforme detalhado na Figura 3.

O achado central deste estudo foi a supressão pronunciada e sustentada da banda teta (4-8 Hz) no grupo tratado com nociceptina (NOCI) em relação ao grupo veículo (VEH). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator grupo ($F(1,9) = 21,05$; $p = 0,0013$), do fator tempo ($F(8,72) = 17,87$; $p < 0,0001$) e, principalmente, da interação grupo × tempo ($F(8,72) = 6,42$; $p < 0,0001$), indicando que a trajetória temporal da potência teta diferiu significativamente entre os animais tratados e os controles. Enquanto o grupo VEH manteve a potência teta relativamente estável (entre 77% e 107% do basal ao longo dos 120 minutos), o grupo NOCI apresentou queda já nos primeiros 5 minutos (49,99 ± 10,70% do basal) e permaneceu suprimido durante praticamente todo o registro, com valores mínimos em torno de 33-35% entre 15 e 60 minutos pós-infusão. As comparações múltiplas de Bonferroni confirmaram diferença significativa entre os grupos em 6 dos 8 pontos temporais avaliados (0-5 min, $p < 0,01$; 5-10 min, $p < 0,05$; 15-20 min, $p < 0,05$; 20-25 min, $p < 0,01$; 25-30 min, $p < 0,05$; 60-

65 min, $p < 0,01$), com tendência à recuperação parcial no ponto final (120-125 min), quando a diferença deixou de ser estatisticamente significativa após a correção.

Concomitantemente à supressão teta, a banda delta (1-4 Hz) também apresentou redução acentuada no grupo NOCI, e não um aumento, como seria esperado caso a nociceptina promovesse simplesmente uma transição para um perfil de sono de ondas lentas. A ANOVA de duas vias identificou efeito significativo do grupo ($F(1,9) = 42,41$; $p = 0,0001$) e uma interação grupo × tempo robusta ($F(8,72) = 8,60$; $p < 0,0001$), sem efeito principal significativo do tempo isoladamente ($F(8,72) = 1,96$; $p = 0,064$). Enquanto o grupo VEH exibiu um discreto aumento de potência delta ao longo da sessão (117-145% do basal, provavelmente refletindo variações comportamentais associadas à exploração do campo aberto), o grupo NOCI apresentou queda constante, atingindo valores tão baixos quanto 40% do basal entre 15 e 30 minutos pós-infusão. O post-hoc de Bonferroni confirmou diferença significativa entre os grupos em 7 dos 8 intervalos temporais (0-5 min, $p < 0,05$; 5-10 min, $p < 0,01$; 15-20 min, $p < 0,01$; 20-25 min, $p < 0,01$; 25-30 min, $p < 0,01$; 60-65 min, $p < 0,05$; 120-125 min, $p < 0,01$), sendo o único ponto sem significância estatística o intervalo de 10-15 min.

Em contraste marcante com o padrão observado nas bandas de baixa frequência, as sub-bandas gama não foram afetadas de forma consistente pela nociceptina. A banda slow gamma (30-55 Hz) não apresentou efeito significativo de grupo ($F(1,9) = 1,02$; $p = 0,34$) nem de interação ($F(8,72) = 1,29$; $p = 0,26$), embora tenha havido efeito significativo do tempo ($F(8,72) = 3,69$; $p = 0,0012$), sugerindo variação temporal comum a ambos os grupos, possivelmente relacionada à habituação comportamental ao ambiente. De forma semelhante, a banda mid gamma não apresentou efeito de grupo ($F(1,9) = 0,17$; $p = 0,69$), de tempo ($p = 0,18$) ou de interação ($p = 0,39$). Já a banda fast gamma exibiu um padrão mais complexo: embora o efeito principal de grupo não tenha atingido significância estatística ($F(1,9) = 4,01$; $p = 0,076$), a interação grupo × tempo foi significativa ($F(8,72) = 2,55$; $p = 0,0165$), refletindo uma divergência progressiva entre as curvas ao longo do tempo, na qual o grupo VEH tendeu a aumentar sua potência gama rápida nos últimos pontos do registro (chegando a 141% do basal aos 120 minutos), enquanto o grupo NOCI tendeu a reduzi-la (58,75% do basal no mesmo intervalo), ainda que nenhum ponto individual tenha permanecido após a correção de Bonferroni.

Por fim, a análise da potência de banda larga (full range, 1-120 Hz) confirmou que a supressão observada nas baixas frequências foi suficiente para reduzir significativamente a potência total do LFP no grupo NOCI (efeito de grupo: $F(1,9) = 13,03$; $p = 0,0057$; interação: $F(8,72) = 4,93$; $p < 0,0001$), com diferenças significativas nos intervalos de 15-20 min ($p < 0,05$), 60-65 min ($p < 0,05$) e 120-125 min ($p < 0,01$).

Em conjunto, estes resultados indicam que a ativação dos receptores NOP no hipocampo dorsal não induz uma simples realocação espectral de teta para delta, como classicamente descrito para estados de sono de ondas lentas induzidos por outros agonistas NOP (Morairty et al., 2023; Whiteside et al., 2024), mas sim uma supressão de banda larga que atinge conjuntamente teta e delta, poupando relativamente as bandas gama. Este padrão é consistente com o mecanismo celular inibitório amplo do receptor NOP: a redução da formação de AMPc, o bloqueio de canais de $Ca2+$ dependentes de voltagem e o aumento da condutância de $K+$ do tipo GIRK (Connor et al., 1996; Vaughan & Christie, 1996; Lüscher & Slesinger, 2010) promovem hiperpolarização e

redução generalizada da liberação de neurotransmissores (Heinricher, 2003; Schlicker & Morari, 2000), o que pode reduzir de forma inespecífica a amplitude de oscilações de baixa frequência, que dependem de sincronização em larga escala de populações neuronais, sem necessariamente favorecer a geração ativa do ritmo delta. A relativa preservação das bandas gama sugere que os microcircuitos locais responsáveis por essas oscilações rápidas, predominantemente interneuronais (Bartos, Vida & Jonas, 2007), podem ser menos sensíveis à ação aguda da nociceptina do que o circuito de geração do ritmo teta, que depende criticamente da aferência septo-hipocampal e de um balanço excitatório-inibitório mais amplo (Vertes & Kocsis, 1997). Esse padrão de supressão de banda larga é compatível com uma alteração no balanço excitação-inibição da rede, refletida na inclinação do espectro de potência (slope 1/f), como demonstrado para outros sistemas neuromoduladores inibitórios (Gao, Peterson & Voytek, 2017). Esses achados sugerem que o efeito da nociceptina sobre a memória não decorre de uma reorganização do tipo vigília-para-sono, mas de uma atenuação generalizada da dinâmica oscilatória de baixa frequência do hipocampo, hipótese que deverá ser testada de forma mais direta com a inspeção dos traçados brutos de LFP e dos espectrogramas, além da avaliação do acoplamento teta-gama e de registros de unidades únicas.

Conclusão

Este estudo investigou o impacto da infusão local de nociceptina na atividade oscilatória da área CA1 do hipocampo dorsal em ratos, revelando que a ativação dos receptores NOP induz uma supressão potente, rápida e duradoura na potência da banda de frequência teta, o ritmo central associado ao aprendizado e à memória, com diferença significativa em relação ao grupo veículo na maioria dos intervalos de tempo avaliados. Diferentemente do inicialmente hipotetizado, a nociceptina não promoveu um aumento da potência delta; ao contrário, também induziu uma supressão robusta e significativa desta banda, indicando que o efeito da droga não corresponde a uma simples realocação teta-para-delta característica de estados de sono ou sedação, mas sim a uma atenuação de banda larga nas frequências mais baixas do hipocampo. As bandas gama, por sua vez, não foram significativamente alteradas pela nociceptina na maior parte do registro, com exceção de uma divergência tardia na banda fast gamma, evidenciada por uma interação grupo × tempo significativa, ainda que sem diferenças pontuais robustas após a correção de Bonferroni, sugerindo que os microcircuitos geradores de oscilações rápidas são relativamente menos sensíveis à ação aguda do peptídeo do que os circuitos de baixa frequência. Essa supressão conjunta de teta e delta refletiu-se também na redução significativa da potência de banda larga, confirmando um efeito de rede amplo e não restrito a uma única banda de frequência. Conclui-se que a nociceptina atua como um regulador inibitório amplo da dinâmica oscilatória de baixa frequência no hipocampo, e não como um indutor seletivo de um estado do tipo sono. Esses resultados fornecem um mecanismo eletrofisiológico de rede que ajuda a explicar os efeitos amnésicos dos agonistas NOP, ao mesmo tempo em que refina a hipótese inicial sobre o mecanismo envolvido.

Referências

Bartos, M.; Vida, I.; Jonas, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. Nature Reviews Neuroscience, v. 8, n. 1, p. 45-56, 2007.

Buzsáki, G. Rhythms of the brain. Oxford: Oxford University Press, 2006.

Buzsáki, G. Hippocampal sharp wave-ripple: a cognitive biomarker for episodic memory and planning. Hippocampus, v. 25, n. 10, p. 1073-1188, 2015.

Connor, M.; YEO, A.; Henderson, G. The effect of nociceptin on Ca2+ channel current and intracellular Ca2+ in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. British Journal of Pharmacology, v. 118, n. 2, p. 205-207, 1996.

Gao, R.; Peterson, E. J.; Voytek, B. Inferring synaptic excitation/inhibition balance from field potentials. NeuroImage, v. 158, p. 70-78, 2017.

Hajós, M. et al. Effects of the gamma-secretase inhibitor semagacestat on hippocampal neuronal network oscillation. Frontiers in Pharmacology, v. 4, artigo 72, 2013.

Heinricher, M. M. Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior. Life Sciences, v. 73, n. 6, p. 813-822, 2003.

Jensen, O.; Colgin, L. L. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. Trends in Cognitive Sciences, v. 11, n. 7, p. 267-269, 2007.

Lisman, J. E.; Jensen, O. The θ-γ neural code. Neuron, v. 77, n. 6, p. 1002-1016, 2013.

Lüscher, C.; Slesinger, P. A. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. Nature Reviews Neuroscience, v. 11, n. 5, p. 301-315, 2010.

Meis, S.; Munsch, T.; Pape, H. C. Antioscillatory effects of nociceptin/orphanin FQ in synaptic networks of the rat thalamus. Journal of Neuroscience, v. 22, n. 3, p. 718-727, 2002.

Meunier, J. C. et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature, v. 377, n. 6549, p. 532-535, 1995.

Mollereau, C.; Mouledous, L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. Peptides, v. 21, n. 7, p. 907-917, 2000.

Morairty, S. R. et al. Activation of the nociceptin/orphanin-FQ receptor promotes NREM sleep and EEG slow wave activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 120, n. 13, p. e2214171120, 2023.

Neal Junior, C. R. et al. Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with 125I-[14Tyr]-orphanin FQ binding. Journal of Comparative Neurology, v. 412, n. 4, p. 563-605, 1999.

Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.

Reinscheid, R. K. et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. Science, v. 270, n. 5237, p. 792-794, 1995.

Ribeiro, L. et al. Hippocampal NOP receptor activation impairs object recognition memory acquisition. Hippocampus, v. 36, p. e70104, 2026. DOI: 10.1002/hipo.70104.

Schlicker, E.; Morari, M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. Peptides, v. 21, n. 7, p. 1023-1029, 2000.

Vaughan, C. W.; Christie, M. J. Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like 1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K+ conductance in dorsal raphe nucleus neurones. British Journal of Pharmacology, v. 117, n. 8, p. 1609-1611, 1996.

Vertes, R. P.; Kocsis, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. Neuroscience, v. 81, n. 4, p. 893-926, 1997.

Whiteside, G. T. et al. The nociceptin/orphanin FQ receptor partial agonist sunobinop promotes non-REM sleep in rodents and patients with insomnia. Journal of Clinical Investigation, v. 134, n. 1, p. e171172, 2024.

Wu, Y. L. et al. Molecular characterization and functional expression of opioid receptor-like1 receptor. Cell Research, v. 7, n. 1, p. 69-77, 1997.

Yu, T. P.; XIE, C. W. Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. Journal of Neurophysiology, v. 80, n. 3, p. 1277-1284, 1998.

Anexos



Figura 1 - Certificado do curso de extensão de formação em proteção dos animais usados em pesquisas



Figura 2 - Esquema representativo do desenho experimental. 1) Registro eletrofisiológico basal de 15 minutos em campo aberto; 2) Infusão intra-hipocampal de veículo (VEH) ou nociceptina (NOCI); 3) Registro pós-infusão por 120 minutos, com avaliação em int



Figura 3 - Variação da potência espectral no hipocampo após infusão intra-hipocampal de nociceptina. Dados de potência (média ± EPM) para os grupos veículo (VEH, N = 5) e nociceptina (NOCI, N = 6), normalizados pelo período basal, para as bandas Delta (A)



Figura 4 - Registros representativos do Potencial de Campo Local (LFP) demonstrando o impacto da nociceptina na ritmicidade do sinal hipocampal. Traçados de LFP normalizados de um animal representativo do grupo VEH (A) e um do grupo NOCI (B) nos períodos



Figura 5 - Análise tempo-frequência (espectrogramas) ilustrando a supressão de baixa frequência induzida pela nociceptina. Espectrogramas representativos para os grupos VEH (A) e NOCI (B) nos períodos basal, 0-5 min, 5-10 min, 1h e 2h pós-infusão, evidenc

CÓDIGO: SB0310

AUTOR: HERBERT FERNANDES DA SILVA

ORIENTADOR: ANDROS TAROUCO GIANUCA

TÍTULO: Substituição de Espécies Compensa a Perda de Diversidade Local em Rios Intermitentes?

Resumo

Mudanças no uso da terra causam perda e fragmentação de habitats, reduzindo a diversidade local (alfa). Em teoria, a dissimilaridade entre locais (beta) poderia aumentar e compensar a diversidade regional (gama). Contudo, estudos em florestas sem histórico de fragmentação natural não encontraram essa compensação sob impactos antrópicos recentes.

Em contrapartida, rios intermitentes possuem fragmentação hidrológica natural, cíclica e previsível, abrigando biotas adaptadas. Nesses sistemas, hipotetizamos redução da diversidade alfa nas poças, mas aumento da beta, compensando a gama. Demonstramos que, em paisagens naturais, a diversidade alfa não diferiu entre rios perenes e intermitentes, mas a diversidade beta e a regional foram maiores nos intermitentes. Por outro lado, o efeito sinérgico entre intermitência e antropização provocou perdas na diversidade alfa não compensadas pela beta. Isso reforça a importância de considerar múltiplos estressores através das escalas espaciais. Aplicadamente, os achados alertam para a urgência de políticas de manejo que reconheçam a vulnerabilidade singular dos rios intermitentes à urbanização, evitando perdas desproporcionais de biodiversidade.

Palavras-chave: rios intermitentes; fragmentação natural; diversidade beta;urbanização

TITLE: Do Species Replacement Compensate for the Loss of Local Diversity in Intermittent Rivers?

Abstract

Land-use changes cause habitat loss and fragmentation, reducing local (alpha) diversity. In theory, dissimilarity between sites (beta) could increase and compensate for regional (gamma) diversity. However, recent studies in forests lacking a history of natural fragmentation found no such compensation under anthropogenic impacts. In contrast, intermittent rivers exhibit natural, cyclical, and predictable hydrological fragmentation, hosting biotas adapted to these dynamics. In these ecosystems, we hypothesized a

reduction in alpha diversity within isolated pools, but an increase in beta diversity, compensating for regional diversity. We demonstrate that, in natural landscapes, alpha diversity did not differ between perennial and intermittent rivers. However, beta and regional diversity were higher in intermittent rivers. Conversely, a synergistic effect between intermittency and landscape anthropization led to alpha diversity losses that were not offset by beta diversity. This highlights the importance of considering multiple stressors across spatial scales. From an applied perspective, these findings underscore the urgent need for management policies that recognize the unique vulnerability of intermittent rivers to urbanization, preventing disproportionate biodiversity loss.

Keywords: intermittent rivers; natural fragmentation;betadiversity;urbanization

Introdução

As mudanças no uso da terra causam a perda e a fragmentação de habitats naturais, configurando a principal ameaça à biodiversidade global (Pimm et al., 2014; Newbold et al., 2015). A fragmentação reduz a conectividade da paisagem, isola populações e compromete o fluxo gênico (Gonçalves-Souza et al., 2025). Embora prevaleça a visão histórica de que seus impactos são estritamente negativos em escalas locais e regionais (Andrén, 1994; Haddad et al., 2015), um aumento no isolamento e no número de manchas pode elevar a heterogeneidade ambiental e, consequentemente aumentar a dissimilaridade composicional entre manchas (i.e., a diversidade beta_ (Fahrig, 2017, 2020). Contudo, evidências empíricas indicam que reduções na diversidade local (alfa) raramente são compensadas por ganhos na diversidade beta, resultando em perdas na diversidade regional (gamma) (Ochoa-Quintero et al., 2015; Prado et al., 2023; Gonçalves-Souza et al., 2025). Tais conclusões derivam sobretudo de ecossistemas terrestres expostos à fragmentação antrópica recente, sem histórico de fragmentações e de respostas adaptativas da biota.

Em ecossistemas aquáticos, a conectividade hidrológica é determinante para a estrutura da biodiversidade em redes fluviais, que abrigam cerca de 10% da fauna animal em menos de 1% da superfície terrestre (Crabot et al., 2021; Datry et al., 2023; Escobar-Camacho et al., 2025). Nos rios intermitentes, a oscilação do fluxo impõe ciclos recorrentes de conectividade e fragmentação em poças isoladas (Messager et al., 2021; Escobar-Camacho et al., 2025). A fase de poças atua como um filtro ambiental severo, reduzindo a diversidade alfa ao selecionar espécies resistentes e/ou resilientes (Datry et al., 2023). Em contrapartida, o isolamento entre poças e a variação nas características físico-químicas entre estas, criam ciclicamente mosaicos heterogêneos promovendo a diversidade beta (Leigh et al., 2016; Escobar-Camacho et al., 2025). Por ser uma propriedade intrínseca, cíclica e previsível, a fragmentação natural nesses rios permitiu a evolução de biotas adaptadas ao isolamento temporário e recorrente (Larned et al., 2010; Stubbington & Datry, 2013; Bogan et al., 2017).

Essa trajetória evolutiva singular torna plausível a hipótese de que rios intermitentes seguem padrões distintos daqueles descritos para sistemas terrestres antrópicos, nos quais os ganhos em diversidade beta não compensam as perdas em diversidade alpha (Gonçalves-Souza et al., 2025). Diante disso, este estudo objetiva investigar se a redução da diversidade alfa decorrente do aumento da intermitência e a variação da diversidade beta associada à fragmentação natural podem gerar um efeito compensatório sobre a

diversidade gamma regional em metacomunidades. Hipotetiza-se que a natureza recorrente e dinâmica da fragmentação nesses ecossistemas sustenta elevada diversidade beta, capaz de compensar perdas na diversidade alpha e manter a diversidade gamma (Datry et al., 2016; Leigh & Datry, 2017). Dessa forma, o trabalho busca avaliar se a fragmentação natural em ecossistemas altamente dinâmicos de rios intermitentes opera sob mecanismos de manutenção da biodiversidade distintos daqueles observados em paisagens terrestres modificadas pelo homem. Avaliamos ainda se os padrões observados para rios intermitentes situados em bacias hidrográficas com paisagens pouco antropizadas diferem daqueles observados em paisagem altamente antropizadas.

Metodologia

Amostragem de Dados

As informações analisadas neste estudo foram obtidas a partir da base de dados Naïades (http://www.naiades.eaufrance.fr/), uma plataforma que compila registros de monitoramento biológico e físico-químico da rede hidrográfica francesa no período de 2007 a 2021. Esse sistema integra campanhas realizadas no contexto da Diretiva-Quadro da Água e levantamentos complementares conduzidos por instituições regionais. A amostragem de macroinvertebrados seguiu os procedimentos normalizados pela Association Française de Normalisation (AFNOR, 2009), empregando uma rede do tipo Surber com 0,05 m² de área e malhagem de 500 µm. Em cada sítio de amostragem, representando uma comunidade local, foram estabelecidos 12 pontos de coleta distribuídos entre os diferentes mesohabitats presentes no trecho, equalizando-se o esforço amostral.

Métricas de uso do solo e intermitência de fluxo

Os trechos fluviais foram categorizados com base no seu grau de intermitência de fluxo (FI), utilizamos a probabilidade de secagem desenvolvida por Snelder et al. (2013) para toda a rede hidrográfica francesa, com base em séries históricas de 23 a 35 anos. Foram definidos como perenes os rios com FI variando de 0 a 0,15, e como não-perenes aqueles com FI entre 0,25 e 0,85. Para evitar incertezas na classificação, os trechos com valores de FI entre 0,15 e 0,25 foram desconsiderados na análise.

Para cada ponto amostral, extraímos a proporção de categorias de uso do solo considerando um buffer longitudinal de 1 km a montante de cada ponto de coleta e uma faixa lateral de 500 m em ambas as margens do canal (ref), a partir dos dados do projeto CORINE Land Cover (CLC) 2018 (ref). Este conjunto de dados vetoriais, organiza o território em 44 classes temáticas distribuídas em cinco macrocategorias: áreas urbanizadas, zonas agrícolas, florestas e ambientes seminaturais, zonas úmidas e corpos d'água. Agregamos as categorias tecido urbano contínuo e descontínuo, zonas industriais e comerciais, redes rodoviárias e ferroviárias, áreas portuárias, aeroportos, minas, depósitos de resíduos, canteiros de obras e espaços verdes urbanos não agrícolas em uma única classe, nomeada “urbanização”.

A escolha da urbanização como métrica de impacto antrópico fundamenta-se em estudos que investigaram as relações entre uso do solo e comunidades de macroinvertebrados em

larga escala. Sponseller et al. (2001) demonstraram que a estrutura das assembléias bentônicas é fortemente influenciada pelos padrões de uso do solo nas bacias de drenagem. Em escala continental, Wasson et al. (2010) evidenciaram que a cobertura artificial do solo — correspondente a áreas urbanas e industriais — constitui a pressão de impacto mais negativo sobre os índices de qualidade ecológica de rios europeus, com efeitos mais consistentes e severos do que aqueles observados para zonas agrícolas. Mais recentemente, Gianuca et al. (2024) demonstraram que a urbanização interage com a intermitência de fluxo modulando a estabilidade das metacomunidades aquáticas, reforçando a relevância dessa métrica em estudos que investigam os efeitos combinados da fragmentação natural e da degradação antrópica sobre a biodiversidade.

Montagem das Metacomunidades:

Para viabilizar a comparação da biodiversidade em diferentes escalas, agrupamos os pontos dentro de metacomunidades, i.e., comunidades locais conectadas por diferentes graus de dispersão das espécies na paisagem. Para reduzir possíveis efeitos de sazonalidade intra-anual, utilizamos somente coletas realizadas entre junho e setembro. Definimos como metacomunidade os pontos dentro de uma mesma bacia hidrográfica, utilizando como base os limites definidos na base de dados HydroBASINS para a Europa. HydroBASINS apresenta 12 níveis de bacias e sub-bacias, divididos pelo critério de Pfafstetter. Para maximizar o número de metacomunidades, utilizamos o sétimo nível.

Foram mantidas nas análises as metacomunidades que possuíam ao menos um par de sítios perenes e um par de sítios intermitentes, por ano. Seguindo estes critérios, tivemos um total de 4 metacomunidades em 2007, 8 em 2008, 12 em 2009, 11 em 2010, 8 em 2011, 13 em 2012, 12 em 2013, 10 em 2014, 8 em 2015, 10 em 2016, 7 em 2017, 9 em 2018, 7 em 2019, 10 em 2020 e 8 em 2021, totalizando 137 metacomunidades não independentes (Figura XX).

Cálculo das métricas

Diferentes números de unidades amostrais (no nosso caso, diferente número de comunidades locais perenes e não-perenes dentro de uma mesma metacomunidade) podem levar a conclusões errôneas. Por isso, adotamos uma metodologia análoga à utilizada em Gonçalves-Souza et al. (2025). Para cada metacomunidade, primeiro calculamos a diversidade alfa (pair) e gamma (pair) médias entre todos os possíveis pares pertencentes ao mesmo regime de fluxo. Então calculamos a média das diversidades entre os pares (psd e psd). Por fim, calculamos psd como psd / psd.

Para limitar os fatores de confusão, também calculamos as métricas controlando pelo decaimento de similaridade causado pela distância, que pode inflar os valores de diversidade e , e pelo tamanho amostral. Para controlar pela distância, permitimos que os pares fossem formados apenas entre comunidades locais vizinhas. Para controlar pelo tamanho amostral, c

Resultados e Discussões

Em condições de baixa urbanização, os rios não-perenes exibiram padrões de diversidade distintos entre as escalas espaciais quando comparados aos rios perenes. Isoladamente, o regime de fluxo não apresentou diferença significativa para a diversidade alfa ($p = 0,573$). Em contrapartida, a diversidade beta respondeu positivamente ao regime de fluxo (beta = 0,11; IC 95%: 0,08–0,15; $p < 0,001$), com rios não-perenes apresentando, em média, maior diversidade beta que rios perenes. Acompanhando esse incremento no turnover espacial, o regime de fluxo também apresentou efeito positivo e significativo sobre a diversidade gama (beta = 5,65; IC 95%: 2,33–8,96; $p = 0,001$), com rios não-perenes exibindo, em baixos níveis de urbanização, diversidade gama superior à dos rios perenes.

Contudo, a introdução do gradiente de urbanização modificou substancialmente essa dinâmica natural. A diversidade alfa foi negativamente afetada pela urbanização (beta = −121,12; IC 95%: −173,84 a −68,40; $p < 0,001$), e a interação entre regime de fluxo e urbanização foi significativa (beta = −65,07; IC 95%: −117,49 a −12,65; $p = 0,015$), indicando que o declínio da diversidade alfa ao longo do gradiente antrópico foi mais acentuado em rios não-perenes do que em rios perenes (Figura 3A). Por sua vez, embora a diversidade beta tenha respondido positivamente à urbanização isoladamente (beta = 0,99; IC 95%: 0,31–1,68; $p = 0,005$), a interação entre os dois fatores foi negativa e significativa (beta = −1,18; IC 95%: −1,96 a −0,39; $p = 0,003$), evidenciando que o aumento da diversidade beta com a urbanização ocorreu predominantemente em rios perenes, ao passo que em rios não-perenes essa relação foi atenuada, aproximando-se da estabilidade (Figura 3B). Quanto à diversidade gama, a urbanização exerceu um efeito negativo significativo (beta = −120,60; IC 95%: −195,18 a −46,03; $p = 0,002$) e a interação entre regime de fluxo e urbanização foi significativa e de maior magnitude relativa entre os três modelos (beta = −136,04; IC 95%: −211,18 a −60,90; $p < 0,001$), indicando uma inversão do padrão ao longo do gradiente: em níveis elevados de urbanização, a diversidade gama de rios não-perenes tornou-se inferior à de rios perenes (Figura 3C).

Em todos os modelos, as covariáveis de controle apresentaram efeitos significativos e no sentido esperado: a abundância total ou média (log-transformada e padronizada) relacionou-se positivamente com a diversidade alfa (beta = 5,40; $p < 0,001$) e gama (beta = 5,19; $p < 0,001$), e a distância média entre pares relacionou-se positivamente com a diversidade beta (beta = 0,03; $p < 0,001$) e gama (beta = 2,39; $p < 0,001$), confirmando a necessidade de controle por decaimento de similaridade com a distância nas análises subsequentes.

Intermitência e Urbanização como Filtros Ambientais que Reduzem a Diversidade Alfa

Ao contrário do que seria esperado pelo arcabouço teórico que posiciona a secagem como um filtro ambiental de primeira ordem em ecossistemas lóticos (Datry et al., 2014; Leigh et al., 2016), nossos resultados revelaram que a redução da diversidade alfa em rios intermitentes não é um fenômeno universal, mas sim um padrão contexto-dependente, condicionado ao nível de urbanização da paisagem. Em metacomunidades com baixa urbanização, a diversidade alfa de rios intermitentes não diferiu significativamente daquela observada em rios perenes, sugerindo que as espécies que persistem nesses sistemas possuem adaptações evolutivas à secagem — como estágios de resistência (ovos, cistos ou formas dormentes) ou alta capacidade de recolonização a partir de refúgios

(Stubbington & Datry, 2013; Bogan et al., 2017) — que lhes conferem resiliência na ausência de estressores adicionais.

No entanto, nossos resultados revelam que a urbanização atua como um filtro ambiental igualmente severo, mas potencialmente distinto em seus mecanismos de ação. Enquanto a intermitência seleciona espécies resistentes à dessecação, a urbanização impõe um conjunto de estressores físico-químicos sintetizados no conceito de "síndrome do rio urbano" (urban stream syndrome): escoamento superficial intensificado, elevação das concentrações de nutrientes e contaminantes, alteração da morfologia do canal e redução da biodiversidade, com aumento de espécies tolerantes (Walsh et al., 2005) . Estudos em bacias hidrográficas altamente urbanizadas demonstram que esses estressores atuam de forma integrada, comprometendo tanto a integridade estrutural quanto a funcionalidade das comunidades bentônicas (Cabrini, 2013) .

Aumento da Diversidade Beta

Diversos estudos sugerem maior diversidade em rios não perenes em relação aos perenes (Datry et al., 2016; Crabot et al., 2021, Escobar-Camacho et al., 2025). Este padrão emerge principalmente em função da fragmentação da paisagem aquática em poças isoladas durante os períodos de seca, o que gera um mosaico de habitats com elevada heterogeneidade ambiental . Em sistemas intermitentes neotropicais, por exemplo, demonstrou-se que sítios intermitentes apresentam maior diversidade beta que sítios perenes, refletindo a existência de múltiplos estágios de recuperação na escala da rede hidrográfica (Datry et al., 2016). Essa heterogeneidade, combinada com a limitação de dispersão imposta pela perda de conectividade hidrológica, promove alta substituição de espécies (turnover) entre trechos, elevando a diversidade beta (Leigh & Datry, 2017).

No entanto, nossos resultados revelam que a urbanização modula este padrão de maneira importante. Em metacomunidades sob alta urbanização, observamos uma tendência de redução da diversidade beta em comparação àquelas sob baixa urbanização, particularmente no cenário de rios intermitentes. Este padrão é consistente com a hipótese de homogeneização biótica induzida por estressores antrópicos (Arroyo-Rodríguez et al., 2013; Lobo et al., 2011). A urbanização, ao impor um conjunto uniforme de condições ambientais degradadas, pode reduzir a heterogeneidade ambiental entre trechos, favorecendo um conjunto restrito de espécies tolerantes e, consequentemente, diminuindo o turnover entre comunidades. Estudos recentes demonstram que rios recentemente tornados intermitentes devido a atividades antrópicas apresentam maior variabilidade nas comunidades de invertebrados, sugerindo que a transição para regimes intermitentes pode aumentar a diversidade beta, mas essa resposta é contexto-dependente (Crabot et al., 2021) .

Gianuca et al. (2024) demonstra que rios intermitentes são estabilizados predominantemente por processos espaciais (assincronia entre locais), enquanto rios perenes dependem mais de processos locais. A urbanização, ao homogeneizar as condições ambientais e reduzir a diversidade beta, pode comprometer justamente o mecanismo de estabilização espacial que confere resiliência às metacomunidades intermitentes, tornando-as mais vulneráveis a perturbações adicionais.

É importante notar, contudo, que parte do aumento da diversidade beta observado em rios intermitentes pode ser atribuível ao efeito do decaimento da similaridade com a distância

(distance decay), conforme demonstrado por Gonçalves-Souza et al. (2025) para sistemas terrestres. Nossas análises complementares com "pares próximos" foram concebidas precisamente para isolar este efeito de confundimento. A comparação entre os cenários "todos os pares" e "pares próximos" nos permite distinguir o aumento da diversidade beta decorrente da própria configuração espacial da rede fluvial daquele atribuível a processos ecológicos associados à intermitência e à urbanização.

Falha na Compensação: Diversidade Beta Não Resgata Diversidade Gamma

Nossa descoberta mais relevante é a constatação de que a relação entre intermitência e diversidade gama é contexto-dependente, invertendo seu sinal em função do nível de urbanização. Em metacomunidades com baixa urbanização, a diversidade gama de rios intermitentes foi superior àquela observada em rios perenes. Este resultado, inicialmente contra intuitivos, encontra respaldo na literatura: a fragmentação da paisagem aquática em poças isoladas durante períodos de seca gera um mosaico de habitats com elevada heterogeneidade ambiental, promovendo alto turnover de espécies entre trechos e, consequentemente, elevada diversidade gama regional (Datry et al., 2016; Crabot et al., 2021). Na ausência de estressores antrópicos adicionais, as adaptações evolutivas das espécies à secagem (Stubbington & Datry, 2013; Bogan et al., 2017) permitem que rios intermitentes funcionam como reservatórios de biodiversidade, abrigando uma diversidade regional que não é encontrada em rios perenes adjacentes.

Este padrão dialoga diretamente com as conclusões de Gonçalves-Souza et al. (2025) e alinha-se com descobertas globais recentes sobre as respostas de comunidades de macroinvertebrados à intermitência e à degradação antrópica (Datry et al., 2016; Crabot et al., 2021; Wasson et al., 2010). A explicação para este fenômeno reside na ecologia das comunidades que persistem em rios intermitentes e no conceito de filtragem ambiental (Datry et al., 2017) . A intermitência atua como um primeiro filtro, eliminando espécies sensíveis à dessecação. A urbanização atua como um segundo filtro, eliminando ou reduzindo a abundância de espécies tolerantes à secagem, mas sensíveis à poluição ou à alteração térmica. O resultado líquido é uma redução drástica no pool regional de espécies disponíveis para compor a diversidade beta.

Em outras palavras, a alta diversidade beta observada em rios intermitentes com baixa urbanização é composta pela substituição de espécies tolerantes à seca. Em contraste, em rios intermitentes com alta urbanização, mesmo este pool restrito de espécies tolerantes é empobrecido, resultando em baixa diversidade alfa, baixa diversidade beta e, consequentemente, diversidade gama extremamente reduzida. Este padrão é consistente com o fenômeno de homogeneização biótica (Arroyo-Rodríguez et al., 2013; Lobo et al., 2011), no qual a substituição de espécies entre comunidades é limitada a um conjunto restrito de táxons generalistas e tolerantes a múltiplos estressores.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que a fragmentação natural em rios intermitentes não constitui, por si só, uma ameaça à biodiversidade regional. Em metacomunidades sob baixa pressão de urbanização, a intermitência de fluxo atua como um mecanismo

compensatório eficaz: a diversidade alfa permanece equivalente à de rios perenes, enquanto a diversidade beta é superior, resultando em maior diversidade gama regional. Esse padrão evidencia que espécies de macroinvertebrados bentônicos adaptadas à secagem cíclica exploram o mosaico de habitats gerado pelo isolamento temporário, sustentando a biodiversidade em escala de paisagem por meio da alta substituição espacial de espécies.

Contudo, o achado central deste trabalho indica que essa capacidade compensatória é contexto-dependente e vulnerável à degradação antrópica. Sob urbanização crescente, a ação sinérgica entre a intermitência natural e o estresse físico-químico associado à síndrome do rio urbano resulta no colapso desse padrão: a diversidade alpha declina acentuadamente em rios não perenes, a diversidade beta não compensa estas perdas locais e, assim, a diversidade gama sofre redução, tornando-se inferior à dos rios perenes. A urbanização compromete, portanto, o próprio mecanismo espacial de estabilização — o turnover de espécies entre poças e trechos — que historicamente conferia resiliência a essas comunidades frente à fragmentação cíclica.

Do ponto de vista conceitual, o trabalho demonstra que a mera distinção entre fragmentação natural e antrópica é insuficiente para prever impactos na biodiversidade, sendo a interação entre ambas o fator determinante para o desfecho regional. Sob a perspectiva aplicada, os achados alertam para a urgência de políticas de manejo que reconheçam a vulnerabilidade singular de rios intermitentes à urbanização, evitando perdas desproporcionais de biodiversidade. Por fim, recomenda-se que estudos futuros incorporem traços funcionais, amplos gradientes de uso do solo e abordagens experimentais para identificar os limiares de degradação a partir dos quais a resiliência natural desses ecossistemas é comprometida.

Referências

ANDRÉN, H. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review. Oikos, v. 71, n. 3, p. 355-366, 1994.

ARROYO-RODRÍGUEZ, V. et al. Designing optimal human-modified landscapes for forest biodiversity conservation. Ecology Letters, v. 23, n. 9, p. 1404-1420, 2020.

BOGAN, M. T.; BOERSMA, K. S.; LYTLE, D. A. Resistance and resilience of invertebrate communities to seasonal and supraseasonal drying in arid-land headwater streams. Freshwater Biology, v. 62, n. 11, p. 1869-1882, 2017.

DATRY, T.; LARNED, S. T.; TOCKNER, K. Intermittent rivers: A challenge for freshwater ecology. BioScience, v. 66, n. 8, p. 759-773, 2016.

FAHRIG, L. Ecological responses to habitat fragmentation per se. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 48, p. 1-23, 2017.

FAHRIG, L. Why do several small patches hold more species than few large patches? Global Ecology and Biogeography, v. 29, p. 615-628, 2020.

HADDAD, N. M. et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. Science Advances, v. 1, n. 2, e1500052, 2015.

LARNED, S. T. et al. Emerging concepts in temporary-river ecology. Freshwater Biology, v. 55, n. 4, p. 717-738, 2010.

LEIGH, C. et al. Invertebrate assemblage responses and metacommunity structure vary with hydrological variability in intermittent rivers. Freshwater Biology, v. 61, n. 8, p. 1296-1312, 2016.

LEIGH, C.; DATRY, T. Drying as a primary hydrological determinant of biodiversity in river systems: A broad-scale analysis. Ecography, v. 40, n. 4, p. 487-499, 2017.

NEWBOLD, T. et al. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. Nature, v. 520, p. 45-50, 2015.

OCHOA-QUINTERO, J. M. et al. Thresholds of species loss in Amazonian deforestation frontier landscapes. Conservation Biology, v. 29, n. 2, p. 440-451, 2015.

PIMM, S. L. et al. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. Science, v. 344, p. 1246752, 2014.

PRADO, P. I.; LOYOLA, R.; METZGER, J. P. Fragmentation and biodiversity patterns in the Atlantic Forest: Revisiting species–area and isolation effects at multiple scales. Diversity and Distributions, v. 29, p. 1249-1262, 2023.

STUBBINGTON, R.; DATRY, T. The macroinvertebrate seedbank promotes community persistence in temporary rivers across climate zones. Freshwater Biology, v. 58, n. 6, p. 1202-1220, 2013.

Anexos



Figura 1. Modelo conceitual das hipóteses sobre os efeitos sinérgicos entre intermitência de fluxo e urbanização sobre as diversidades alfa, beta e gama.



Figura 2. Distribuição espaço-temporal dos sítios amostrais de macroinvertebrados bentônicos utilizados no estudo, na região sul da França (2007–2021). Cada painel

representa um ano de amostragem, mostrando a localização geográfica das comunidades locais



Figura 3. Efeitos interativos da urbanização e do regime de fluxo sobre as diversidades alfa, beta e gama em metacomunidades de rios franceses. Relações entre a proporção de urbanização na bacia de captação e (A) diversidade alfa, (B) diversidade beta e (



Tabela 1. Efeitos de regime de fluxo, urbanização e sua interação sobre as diversidades alfa, beta e gama em metacomunidades de rios franceses.

CÓDIGO: SB0320

AUTOR: EDLA MAIRA NASCIMENTO DA SILVA DE SOUZA

COAUTOR: HENRIQUE DOUGLAS DOS SANTOS BORBUREMA

COAUTOR: HELLEN CAROLINY SANTOS VALENTIM LOPES

ORIENTADOR: ELIANE MARINHO SORIANO

TÍTULO: Efeitos interativos de ondas de calor e eutrofização na ecofisiologia de Gracilaria caudata: crescimento e desempenho fotossintetizante

Resumo

As ondas de calor marinhas e a eutrofização costeira são importantes fatores de estresse associados às mudanças climáticas globais, podendo afetar a ecofisiologia de macroalgas marinhas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos combinados de ondas de calor marinhas simuladas e do aumento da disponibilidade de nutrientes sobre o crescimento e o desempenho fotossintetizante da macroalga Gracilaria caudata. O experimento foi conduzido em condições controladas de laboratório, utilizando diferentes cenários de temperatura (28, 30, 32 e 34 °C) e disponibilidade de nutrientes. Foram avaliadas as taxas de crescimento relativo e o rendimento quântico efetivo do fotossistema II antes, durante e após à exposição ao estresse térmico. Os resultados demonstraram que as ondas de calor reduziram significativamente o crescimento da espécie, especialmente nos tratamentos com temperaturas mais elevadas. Em contrapartida, o desempenho fotossintetizante apresentou recuperação após o período de estresse térmico na maior parte dos tratamentos. Além disso, a disponibilidade de nutrientes influenciou as respostas fisiológicas observadas. Os resultados contribuem para a compreensão dos efeitos interativos entre aquecimento dos oceanos e eutrofização sobre as macroalgas tropicais, fornecendo informações relevantes para prever os potenciais impactos das mudanças ambientais sobre espécies de importância ecológica e econômica.

Palavras-chave: Gracilaria caudata. Ondas de calor. Eutrofização. Mudanças Climáticas.

TITLE: Interactive effects of heatwaves and eutrophication on the ecophysiology of Gracilaria caudata: growth and photosynthetic performance

Abstract

Marine heatwaves and coastal eutrophication are important stress factors associated with global climate change, which can affect the ecophysiology of marine macroalgae. So, this study aimed to evaluate the combined effects of simulated marine heatwaves and increased nutrient availability on the growth and photosynthetic performance of the macroalga Gracilaria caudata. The experiment was conducted under controlled laboratory conditions, using different temperature scenarios (28, 30, 32, and 34 °C) and nutrient availability. Relative growth rates and the effective quantum yield of photosystem II were evaluated before, during, and after exposure to thermal stress. The results showed that heatwaves significantly reduced the growth of the species, especially in treatments with higher temperatures. On the other hand, photosynthetic performance showed recovery after the period of thermal stress in most treatments, nutrient availability also influenced how the plants responded. The results help to understand how ocean warming and eutrophication interact and affect tropical macroalgae, providing important information to predict the possible impacts of environmental changes on species that have ecological and economic value.

Keywords: Gracilaria caudata. Heat waves. Eutrophication. Climate Change.

Introdução

Ondas de calor marinhas têm sido apontadas como uma das principais consequências do aquecimento global. MHWs são definidas como eventos anormalmente quentes nos quais as temperaturas da superfície do mar em uma área específica ultrapassam o percentil 90, com base em 30 anos de dados históricos, por pelo menos cinco dias consecutivos (Hobday et al., 2016). Eventos de ondas de calor resultam em redução do crescimento e da eficiência fotossintetizante de macroalgas marinhas, destacando os efeitos negativos do estresse térmico sobre espécies de importância ecológica e econômica (Borburema et al., 2025). Além do aquecimento dos oceanos, a eutrofização antropogênica é outro fator de impacto para comunidades de macroalgas (Piazzi et al., 2017). Devido ao crescimento e intensificação de atividades humanas nas zonas costeiras, a eutrofização costeira tem se tornado frequente, causada pelo excesso de nutrientes (Silva et al., 2023). Na natureza, raramente esses fatores atuam de modo isolado. Assim, o impacto das ondas de calor marinhas nas macroalgas podem ser alterados por outros fatores, como a eutrofização. Essa combinação gera respostas ecológicas mais complexas do que se analisássemos cada fator isoladamente. Gouvêa et al. (2017) demonstraram que a atuação desses fatores juntos altera processos fisiológicos e taxas de crescimento de macroalgas, reforçando a avaliação conjunta desses fatores para obter uma compreensão mais realista das respostas das macroalgas marinhas frente às mudanças ambientais globais. Apesar do crescimento de estudos sobre ondas de calor e macroalgas marinhas (e.g., Gouvêa et al., 2017; Borburema et al., 2025), ainda há lacunas relacionadas aos efeitos do aquecimento e eutrofização sobre macroalgas tropicais, considerando que a maior parte dos estudos sobre esse tema concentra-se em regiões temperadas.

As macroalgas do gênero Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta) são importantes componentes dos ecossistemas costeiros. Desempenham um papel importante na produção primária, contribuindo para fixação de carbono e produção de oxigênio. Além disso, a formação de bancos de macroalgas funciona como abrigo para organismos

associados (Carneiro e Marinho-Soriano, 2021). Além do papel ecológico, as macroalgas vêm crescendo no mercado econômico devido à utilização de seus polissacarídeos e seus compostos bioativos. Espécies de Gracilaria possuem valor econômico por serem fontes de ágar, polissacarídeo utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

As diferentes respostas das macroalgas para a variação ambiental podem ser medidas por diferentes parâmetros ecofisiológicos que refletem seu estado metabólico. Por isso, parâmetro como o crescimento é frequentemente utilizado para avaliar a resposta desses organismos ao ambiente. Embora diversos estudos tenham investigado os efeitos de fatores ambientais sobre espécies de macroalgas, a grande maioria acaba avaliando esses estressores de forma isolada. Considerando que em ambientes naturais os organismos marinhos estão frequentemente expostos à ação simultânea de múltiplos fatores, ainda são escassos os estudos que investigam como ondas de calor marinhas e a eutrofização atuam em conjunto sobre o desempenho de espécies de Gracilaria. Essa lacuna acaba limitando a compreensão dos impactos das mudanças climáticas globais sobre a ecofisiologia das espécies.

Diante desse cenário, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos combinados de ondas de calor marinhas simuladas e do aumento de nutrientes sobre a ecofisiologia de Gracilaria caudata, com foco no crescimento e no desempenho fotossintetizante.

Metodologia

Coleta, triagem e aclimatação

Espécimes de Gracilaria caudata foram coletados em um banco natural localizado na praia de Mãe Luíza (Natal/RN). As algas foram coletadas na maré baixa em Janeiro de 2026. Após a coleta, as algas foram transportadas para o laboratório de Macroalgas Marinhas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. No laboratório, as algas foram triadas para a remoção de sedimentos, epífitas e fauna associada. Após o procedimento de triagem, as algas foram mantidas em aquários de 10 litros com aeração intermitentemente (30 min: 30 min) para aclimatação às condições laboratoriais. O processo de aclimatação teve duração de 21 dias, na qual as algas foram mantidas sob temperatura de 28 ºC e em água do mar filtrada enriquecida com a solução de nutrientes de von Stosch a 25%.

Experimento de simulação das ondas de calor marinhas e eutrofização

O experimento foi conduzido utilizando quatro aquários de 50 L contendo aproximadamente 6 L de água em cada aquário para o estabelecimento das temperaturas como sistemas de banho-maria (a temperatura da água era controlada por termostatos). Em cada aquário foram distribuídos oito Erlenmeyers de 500 mL contendo 400 mL de meio de cultura. Cada Erlenmeyer recebeu uma biomassa inicial de 200 mg de G. caudata. Dos oito Erlenmeyers, em quatro a água do mar filtrada foi enriquecida com a solução de nutrientes de von Stosch na concentração de 50% (VS/2), representando um cenário de hipereutrofização, enquanto a água do mar dos quatro restantes foi enriquecida com a solução de von Stosch na concentração de 25% (VS/4). As macroalgas foram cultivadas por duas semanas sob a temperatura de 28 ºC (condição antes das ondas de calor marinhas simuladas), então, as temperaturas de três aquários foram ajustadas para 30 ºC (+ 2ºC),

32 ºC (+ 4ºC) e 34 ºC (+ 6ºC), enquanto a temperatura de um aquário foi mantida a 28 ºC como um controle. A simulação das ondas de calor marinhas durou uma semana. Após esse período, as temperaturas dos tratamentos de MHWs foram reajustadas para a temperatura de 28 ºC, e as macroalgas foram cultivadas por mais duas semanas como um período de recuperação após o estresse térmico.

As temperaturas dos tratamentos foram monitoradas diariamente ao longo de todo o período experimental. Durante o experimento, os meios de cultura foram semanalmente submetidos e a aeração foi intermitente em ciclos de 30 min: 30 min. Adicionalmente, os Erlenmeyers foram reposicionados diariamente para garantir que todas as réplicas recebessem intensidade luminosa semelhante ao longo do experimento.

Taxa de crescimento

A biomassa das algas foi determinada semanalmente durante as trocas do meio de cultura, utilizando uma balança analítica. Antes da pesagem, o excesso de água sobre os talos era removido cuidadosamente com papel toalha, de modo a minimizar interferências na determinação da biomassa fresca. Ao final do experimento, foram calculadas as taxas de crescimento (% dia^{-1}) para as diferentes condições experimentais: pré-exposição às ondas de calor marinhas (BHW), durante a exposição às ondas de calor marinhas (UHW) e após o período de recuperação (R). Os cálculos foram realizados de acordo com a fórmula recomendada por Yong et al. (2013).

Desempenho fotossintetizante

O desempenho fotossintetizante das algas foi avaliado por meio de medidas de fluorescência da clorofila a utilizando um fluorômetro do tipo Diving-PAM. O rendimento quântico efetivo do fotossistema II [Y(II)] foi determinado mediante a aplicação de um pulso saturante de luz vermelha com intensidade de 1500 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e duração de 0,6 s. As medições foram realizadas em diferentes etapas do experimento, correspondendo aos períodos pré-exposição às ondas de calor, durante a exposição às ondas de calor e após o período de recuperação. Essas avaliações permitiram monitorar as alterações no desempenho fotossintetizante das algas em resposta ao estresse térmico e sua posterior capacidade de recuperação.

Análise dos dados

As diferenças nas taxas de crescimento e desempenho fotossintetizante foram avaliadas por meio de ANOVA bifatorial para medidas repetidas, considerando os fatores tratamento, tempo (BHW, UHW, R) e a interação entre os fatores. Quando identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$), aplicou-se o teste post hoc de Tukey para comparação das médias. Os gráficos foram elaborados com base nas médias ± desvio-padrão de cada tratamento, utilizando o software Excel. As análises estatísticas foram conduzidas no Rstudio.

Resultados e Discussões

Taxa de crescimento

A taxa de crescimento relativo (RGR) de Gracilaria caudata variou entre os diferentes tratamentos. Os maiores valores foram observados nos tratamentos +2°C_VS/4 (5,27 % dia^{-1}) e +4°C_VS/2 (4,80 % dia^{-1}), enquanto o menor crescimento foi registrado no Controle VS/2 (3,56 % dia^{-1}) (Fig. 1).

Após sete dias sob as ondas de calor marinhas simuladas, observou-se redução na RGR em todos os tratamentos. As taxas de crescimento variaram entre 0,12 a 2,39 % dia^{-1}, sendo o maior valor registrado no tratamento +2°C_VS/4 (2,39 % dia^{-1}). O teste de Tukey indicou que +2°C_VS/4 apresentou crescimento significativamente superior ao demais tratamentos: Controle VS/2, Controle VS/4, +2°C_VS/2, +4°C_VS/2, +4°C_VS/4, +6°C_VS/2 e +6°C_VS/4 ($p < 0,05$). Os menores valores foram observados sob os tratamentos +6°C, principalmente em +6°C_VS/4 (0,12 % dia^{-1}), evidenciando os efeitos negativos do aquecimento mais intenso sobre o crescimento da espécie (Fig. 1).

Durante o período de recuperação, a RGR permaneceu reduzida em comparação ao período antes das ondas de calor marinhas simuladas em todos os tratamentos. As taxas de crescimento variaram entre 0,30 a 1,16 % dia^{-1}, sendo novamente o tratamento +2°C_VS/4 que apresentou os maiores valores médios de crescimento (1,16%). Apesar do fim do estresse térmico, nenhum dos tratamentos recuperou os níveis de crescimento observados antes da exposição às MHWs.

A análise dos períodos experimentais (Tabela 1) revelou uma redução significativa do crescimento entre os períodos antes e sob as MHWs, bem como entre o período antes das MHWs e recuperação (Tukey, $p < 0,001$). Além disso, as taxas de crescimento observadas após a recuperação permaneceram significativamente menores do que aquelas registradas durante à exposição às MHWs ($p = 0,003$).

Desempenho fotossintetizante

Os tratamentos apresentaram uma redução do Y(II) durante a exposição às ondas de calor marinhas simuladas, em seguida por uma recuperação após o período de estresse térmico. A ANOVA revelou um efeito significativo dos tratamentos ($p = 0,00013$) e dos períodos ($p < 0,001$), enquanto a interação entre os fatores não foi significativa ($p = 0,705$). (Tabela 2).

Antes da simulação das ondas de calor marinhas, os valores médios de Y(II) variaram entre 0,54 e 0,60. Sendo os tratamentos Controle VS/4 e +2 °C_VS/2 os maiores valores (0,60) e o tratamento +4°C_VS/2 o menor valor de desempenho (0,54).

Observou-se uma redução do Y(II) durante o período de exposição às ondas de calor marinhas em praticamente todos os tratamentos. Os maiores valores foram observados em Controle VS/4 (0,58) e +4°C_VS/4 (0,55), enquanto os menores valores de desempenho foram observados em +6°C_VS/4 (0,49), +4°C_VS/2 (0,50) e +6°C_VS/2 (0,50).

No período de recuperação, os valores de Y(II) aumentaram em todos os tratamentos em comparação ao período durante as ondas de calor. Sete dos oitos tratamentos avaliados apresentaram valores superiores aos registrados no período antes da exposição ao estresse.

Os maiores valores foram no Controle VS/4 e +2°C_VS/2 (0,63), seguidos por Controle VS/2 (0,62). Apenas o tratamento +6°C_VS/4 não apresentou recuperação completa, registrando valor final (0,56) inferior ao observado antes da exposição às ondas de calor (0,59). As comparações múltiplas pelo teste de Tukey revelaram diferenças significativas entre alguns tratamentos. O tratamento Controle VS/4 apresentou valores de Y(II) significativamente superiores aos observados em +4°C_VS/2, +6°C_VS/2 e +6°C_VS/4.

Em relação ao fator tempo, o período durante as ondas de calor apresentou valores de Y(II) significativamente inferiores aos observados antes da exposição às ondas. Após a recuperação, os valores aumentaram significativamente em relação ao período de estresse térmico. O período de recuperação também apresentou valores superiores aos observados antes das ondas de calor.

Discussão

A partir deste estudo foi possível avaliar como ondas de calor marinhas simuladas e excesso de nutrientes podem influenciar a ecofisiologia de Gracilaria caudata. Foram observadas alterações tanto nas taxas de crescimento quanto no desempenho fotossintetizante das macroalgas ao longo dos períodos experimentais, indicando respostas fisiológicas ao estresse térmico. De modo geral, os resultados sugerem que o aquecimento afeta negativamente o crescimento e a atividade fotossintetizante da espécie, permitindo discutir possíveis respostas de macroalgas tropicais aos cenários futuros de mudanças climáticas e eutrofização costeira.

Os menores valores de crescimento observados nos tratamentos +6°C (34 °C) sugerem que temperaturas mais elevadas podem representar uma condição desfavorável para a produção de biomassa. Em contraste, os maiores valores registrados em +2 °C (30°C) indicam que aumentos moderados de temperatura podem não ser necessariamente prejudiciais à espécie. Esse padrão é semelhante ao observado para outras espécies do gênero Gracilaria, cujo crescimento tende a ser favorecido em temperaturas intermediárias, enquanto temperaturas próximas a 35 °C estão associadas à redução do crescimento ou letalidade (Chiaramonte et al., 2023; Borburema et al., 2025). Embora populações do Nordeste brasileiro sejam consideradas mais adaptadas às altas temperaturas (Chiaramonte et al., 2023), os resultados sugerem que eventos extremos de aquecimento ainda podem comprometer o desempenho fisiológico dessas macroalgas.

A disponibilidade de nutrientes também parece ter influenciado as respostas observadas nos tratamentos, uma vez que diferenças entre VS/2 e VS/4 foram observadas ao longo do experimento. As diferenças observadas entre os tratamentos sugerem que a disponibilidade de nutrientes pode influenciar a forma como G. caudata responde ao aumento da temperatura. Dessa maneira, os resultados indicam uma possível atuação sinérgica entre eutrofização e aquecimento, na qual as condições nutricionais do ambiente podem modificar os efeitos do estresse térmico sobre o crescimento da espécie (Gouvêa et al., 2017). Em geral, menores taxas de crescimento foram observadas nos tratamentos com maior disponibilidade de nutrientes. Estes resultados são consistentes com aqueles

reportados por Marchi et al. (2026), que também registraram menores taxas de crescimento de G. caudata sob maior disponibilidade de nutrientes (VS/2) e estresse térmico. Maiores temperaturas diminuem o desempenho fisiológico da macroalga, e as maiores concentrações de nutrientes favorecem bactérias e epífitas (observadas no presente estudo) que podem se proliferar sobre a superfície das macroalgas sob condições de aumento de temperatura (Fernandes et al., 2011; Borburema et al., 2020). Estes epibiontes competem com as macroalgas pelos nutrientes e geralmente liberam compostos nocivos às algas (Berland et al., 1972), intensificando os efeitos negativos do aumento de temperatura.

Em relação ao desempenho fotossintetizante, observou-se redução dos valores de Y(II) durante à exposição às ondas de calor marinhas simuladas, seguido por recuperação após o retorno das temperaturas às condições controle. A recuperação observada em praticamente todos os tratamentos sugere que os efeitos do aquecimento sobre o aparato fotossintetizante foram predominantemente reversíveis. Essa rápida recuperação de Y(II) já foi descrita para outras macroalgas e está associada à elevada capacidade de reparo do fotossistema II após eventos de aquecimento de curta duração (Kolzenburg et al., 2023). Por outro lado, a não recuperação observada em +6 °C_VS/4 sugere que temperaturas extremas podem gerar efeitos persistentes e irreversíveis, uma vez que o excesso de calor pode comprometer processos fotossintetizantes e de crescimento quando os limites fisiológicos são ultrapassados (Yucharoen et al., 2021).

Apesar dos resultados obtidos, algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos dados. O experimento foi conduzido em condições controladas e por um período relativamente curto, o que pode não contemplar integralmente a complexidade e a variabilidade dos ambientes naturais. Entretanto, mesmo sob essas condições, os resultados indicaram que o aquecimento e o aumento da disponibilidade de nutrientes foram capazes de influenciar o crescimento e o desempenho fotossintetizante de Gracilaria caudata. Nesse sentido, estudos futuros conduzidos por períodos mais prolongados, incluindo diferentes fases de exposição e recuperação, poderão fornecer informações adicionais sobre a capacidade de tolerância, aclimatação e resposta fisiológica da espécie frente a condições associadas ao aquecimento oceânico e à eutrofização costeira.

Conclusão

Os resultados demonstraram que ondas de calor marinhas simuladas afetaram o crescimento e o desempenho fotossintetizante de Gracilaria caudata, com redução do crescimento sob temperaturas elevadas e recuperação parcial da atividade fotossintética após o estresse térmico. A disponibilidade de nutrientes também influenciou essas respostas, com efeitos mais negativos observados nas maiores concentrações. Esses resultados contribuem para a compreensão da vulnerabilidade de macroalgas tropicais diante do aquecimento oceânico associado à eutrofização costeira. Estudos futuros, com períodos mais prolongados de exposição e recuperação, poderão ampliar o conhecimento sobre a tolerância e a capacidade de aclimatação da espécie. O estudo também contribui para os ODS 13 (Ação contra a Mudança Global do Clima) e 14 (Vida na Água).

Referências

BERLAND, B. R.; BONIN, D. J.; MAESTINI, S. T. Are some bacteria toxic for marine algae? Marine Biology, v. 12, p. 189–193, 1972.

BORBUREMA, H. D. S.; LIMA, R. P.; MIRANDA, G. E. C. Effects of ocean warming, eutrophication and salinity variations on the growth of habitat-forming macroalgae in estuarine environments. Acta Botanica Brasilica, v. 34, p. 662–672, 2020.

BORBUREMA, H. D. S.; ALMEIDA-FARIA, G.; SILVEIRA, S. L. C.; GOMES, V. S.; NAUER, F.; MARINHO-SORIANO, E. Agarophyte seaweeds exhibit differential responses to marine heatwaves depending on the species and climatic season. Journal of Applied Phycology, v. 37, p. 1479–1491, 2025.

CARNEIRO, M. A. A.; MARINHO-SORIANO, E. Macroalgas marinhas: biologia, ecologia e importância econômica.Via Design Publicações, p. 90–119, 2021.

CHIARAMONTE, A. R.; FARIA, A. V. F.; PLASTINO, E. M. Thermal tolerance of the red alga Gracilaria caudata reveals ecotypes for the Brazilian coast. Journal of Applied Phycology, v. 36, p. 1009–1022, 2023.

FERNANDES, D. R. P.; YOKOYA, N. S.; YONESHIGUE-VALENTIM, Y. Protocol for seaweed decontamination to isolate unialgal cultures. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 21, p. 313–316, 2011.

GOUVÊA, L.; SCHUBERT, N.; MARTINS, C.; SISSINI, M. N.; RAMLOV, F.; OLIVEIRA, E. R.; BASTOS, E.; FREIRE, V. C.; MARASCHIN, M.; SIMONASSI, J. C.; VARELA, D. A.; FRANCO, D.; CASSANO, V.; FONSECA, A. Interactive effects of marine heatwaves and eutrophication on the ecophysiology of a widespread and ecologically important macroalga. Limnology and Oceanography, v. 62, p. 1797–1809, 2017.

HOBDAY, A. J.; ALEXANDER, L. V.; PERKINS-KIRKPATRICK, S.; SMALE, D. A.; STRAUB, S. C.; OLIVER, E. C. J.; BENTHUYSEN, J. A.; BURROWS, M. T.; DONAT, M. G.; FENG, M.; HOLBROOK, N. J.; MOORE, P. J.; SCANNELL, H. A.; SEN GUPTA, A.; WERNBERG, T. A hierarchical approach to defining marine heatwaves. Progress in Oceanography, v. 141, p. 227–238, 2016.

IPCC. Mudanças climáticas 2023: relatório de síntese: contribuição dos Grupos de Trabalho I, II e III para o Sexto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas. Genebra: IPCC, 2023.

KOLZENBURG, R.; RAGAZZOLA, F.; TAMBURELLO, L.; NICASTRO, K. R.; MCQUAID, C. D.; ZARDI, G. I. Photosynthetic response to a winter heatwave in

leading and trailing edge populations of the intertidal red alga Corallina officinalis (Rhodophyta). Acta Oceanologica Sinica, v. 43, p. 70–77, 2023.

MARCHI, F.; PLASTINO, E. M.; FUJII, M. T. Environmental modulation of sex determination and phenotypic traits of Gracilaria caudata (Gracilariales, Rhodophyta): responses to temperature and nutrient concentration. Journal of Applied Phycology, v. 38, p. 1521–1533, 2026.

NAÇÕES UNIDAS (ONU). Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. As Nações Unidas no Brasil, [s. d.].

PIAZZI, L.; CECCHERELLI, G. Eutrophication affects the resistance of fucoids to an introduced alga spread. Marine Environmental Research, v. 129, p. 189–194, 2017.

SILVA, J. C. C.; JANNUZZI, L. G. S.; TRAVASSOS, R. K.; SILVA, B. J.; SANTANA, M. T. F.; SARAIVA, S. G. L.; FURTADO, L. M.; FLORES MONTES, M. J. Processos de eutrofização em estuários tropicais do Nordeste do Brasil: litoral sul de Pernambuco. Tropical Oceanography, v. 50, p. 1–33, 2023.

YONG, Y. S.; YONG, W. T. L.; ANTON, A. Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. Journal of Applied Phycology, v. 25, p. 1831–1834, 2013.

YUCHAROEN, M.; SINUTOK, S.; CHOTIKARN, P.; BUAPET, P. Experimental assessment of vulnerability to warming in tropical shallow-water marine organisms. Frontiers in Marine Science, v. 8, 767628, 2021.

Anexos



Figura 1. Taxa de crescimento relativo de Gracilaria caudata submetida a diferentes combinações de temperatura e disponibilidade de nutrientes durante diferentes condições experimentais (antes, durante e após as ondas de calor marinhas simuladas).



Tabela 1. Efeitos dos tratamentos, do tempo e da interação tratamento X tempo sobre a taxa de crescimento relativo de Gracilaria caudata, avaliados por ANOVA bifatorial com medidas repetidas.



Figura 2. Desempenho fotossintético de Gracilaria caudata submetida a diferentes combinações de temperatura e disponibilidade de nutrientes durante diferentes condições experimentais (antes, durante e após as ondas de calor marinhas simuladas).



Tabela 2. Efeitos dos tratamentos, do tempo e da interação tratamento X tempo sobre o rendimento quântico efetivo de Gracilaria caudata, avaliados por ANOVA bifatorial com medidas repetidas.

CÓDIGO: SB0336

AUTOR: DANIEL DA COSTA SILVA

ORIENTADOR: ADRIAN ANTONIO GARDA

TÍTULO: Barcoding da Herpetofauna do Parque Estadual Caminho dos Gerais, Minas Gerais, Brasil

Resumo

Este estudo aborda o barcoding molecular da herpetofauna do Parque Estadual Caminho dos Gerais, no norte de Minas Gerais, uma area ecotonal entre Caatinga e Cerrado marcada por elevada heterogeneidade ambiental e lacunas de conhecimento taxonomico e biogeografico. O inventario previo registrou 732 individuos distribuidos em 70 especies de anfibios e repteis, incluindo 29 especies de anfibios, mas a identificacao de parte dos taxa permanece incerta devido a semelhancas morfologicas e a possivel ocorrencia de linhagens distintas no sul da Caatinga. O objetivo do trabalho e sequenciar amostras de duas unidades por especie coletada para confirmar a identidade taxonomica com base no gene mitocondrial 16S e comparacao com sequencias disponiveis em bancos de dados publicos. Ate o momento, 18 amostras da familia Leptodactylidae foram submetidas a extracao, PCR e purificacao. As sequencias geradas serao editadas, alinhadas e analisadas por inferencia Bayesiana e Maxima Verossimilhanca, visando testar o agrupamento genealogico das amostras e detectar divergencias geneticas relevantes. Espera-se que os resultados confirmem a identidade molecular das especies e revelem possiveis casos de especies cripticas ou inconsistencias na identificacao morfologica, contribuindo para o conhecimento e a conservacao da biodiversidade da Caatinga.

Palavras-chave: Herpetofauna; DNA barcoding; Caatinga; ecotono Caatinga-Cerrado.

TITLE: Herpetofauna Barcoding of the Caminho dos Gerais State Park, Minas Gerais, Brazil

Abstract

This study addresses the molecular barcoding of the herpetofauna from Caminho dos Gerais State Park, northern Minas Gerais, an ecotonal area between the Caatinga and Cerrado characterized by high environmental heterogeneity and major taxonomic and biogeographic knowledge gaps. A previous inventory recorded 732 individuals belonging to 70 amphibian and reptile species, including 29 amphibian species, but the identification of some taxa remains uncertain due to morphological similarity and the

possible occurrence of distinct lineages in the southern Caatinga. The main objective is to sequence two samples per collected species in order to confirm taxonomic identity based on the mitochondrial 16S gene and comparison with sequences available in public databases. So far, 18 samples from the family Leptodactylidae have undergone DNA extraction, PCR, and purification. The resulting sequences will be edited, aligned, and analyzed using Bayesian Inference and Maximum Likelihood to test genealogical clustering and detect relevant genetic divergence. The expected results include confirmation of species identities and the detection of possible cryptic species or inconsistencies in previous morphological identifications, contributing to biodiversity knowledge and conservation in the Caatinga.

Keywords: Herpetofauna; DNA barcoding; Caatinga; Caatinga-Cerrado ecotone.

Introdução

A compreensão da biodiversidade em larga escala ainda é limitada pelas lacunas de conhecimento, destacando-se o déficit Linneano (espécies não descritas) e Wallaceano (distribuição geográfica pouco conhecida) (Hortal et al. 2015). Essas limitações comprometem o avanço da ciência básica e a eficácia das estratégias de conservação, sobretudo nos hotspots de biodiversidade regiões com alta riqueza, endemismo e forte ameaça (Mittermeier et al. 2005). Dos 35 hotspots globais, oito localizam-se na região Neotropical, onde a persistência de lacunas taxonômicas e geográficas a torna uma área prioritária para inventários (Myers et al. 2000, Antonelli et al. 2018).

Além dos hotspots, os Neotrópicos abrigam biomas megadiversos e subestimados, como a Caatinga. Estudos recentes revelaram que este bioma é heterogêneo e complexo, com distritos biogeográficos distintos definidos por características edáficas e geomorfológicas, como solos cristalinos, sedimentares e cársticos (Moro et al. 2024). A Caatinga é a região semiárida mais biodiversa do mundo, abrigando, por exemplo, 98 espécies de anfíbios e 3.150 de angiospermas (de Queiroz et al. 2017, Garda et al. 2017). Contudo, apenas 7,4% do bioma está em áreas protegidas, enquanto 63,3% já foi alterado por atividades humanas. Projeções climáticas indicam aumento de até 4°C e redução na precipitação até 2100, o que pode agravar a desertificação (Silva and Barbosa 2017, Silva et al. 2017, Torres et al. 2017). Soma-se a isso o fato de que grandes extensões da Caatinga nunca foram pesquisadas (Garda et al. 2017).

Essa escassez de dados é crítica para répteis e anfíbios. Cerca de 53% da área da Caatinga (70% dos municípios) não possui registro científico para lagartos, e os dados sobre anfíbios são igualmente escassos (Garda et al. 2017, Uchôa et al. 2022). Embora o número de espécies de anfíbios registradas tenha quase dobrado entre 2003 e 2017 (Garda et al. 2017), a falta de inventários contínuos leva à subestimação da biodiversidade e dificulta ações de conservação (Marques et al. 2023).

Embora descrições recentes venham reduzindo o déficit Linneano, o déficit Wallaceano persiste, especialmente em zonas de transição entre Caatinga e Cerrado (Guedes et al. 2014, Garda et al. 2017, Uchôa et al. 2022). O Parque Estadual Caminho dos Gerais (PECG), no norte de Minas Gerais, situa-se exatamente nessa região ecotonal e sob influência da Serra do Espinhaço, onde a identificação morfológica de certos táxons é

complexa devido à presença de linhagens distintas associadas a espécies de ampla distribuição.

Com isso, a identificação de algumas espécies é duvidosa, dependendo também de dados genéticos. Essa necessidade é exacerbada, ainda, devido à presença de diversas espécies distintas no sul da caatinga que são associadas a espécies amplamente distribuídas mais ao norte. Dessa forma, os objetivos desse projeto são sequenciar dois indivíduos de cada espécie coletada durante a expedição para confirmar sua identificação nas bases de dados disponíveis na internet, como o GenBank.

Metodologia

A amostragem foi realizada a partir de amostras de tecidos do fígado preservadas em etanol 99%, ao longo da distribuição das espécies e tombadas na coleção de tecidos do Laboratório de Anfíbios e Répteis da UFRN. Até o presente momento conseguimos fazer extração, PCR e purificação de 18 amostras, que correspondem a toda família leptodactylidae, porém ainda não foram enviadas para sequenciamento. Além delas, vamos utilizar sequências disponíveis no GenBank (repositório internacional de sequências genéticas mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI - USA). Construiremos um banco de dados a partir de sequências de dados do gene mitocondrial 16S para anfíbios.

O método utilizado para extração do DNA foi o de extração salina (Aljanabi and Martinez 1997), e os produtos da extração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), o que permitiu a constatação da presença e concentração de DNA. Fragmentos de aproximadamente 550 pares de bases para 16S foram amplificados usando os primers 16S A-L(Forward 5' - CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT - 3') e 16S B-H(Reverse 5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T – 3) de (Palumbi 1996). Esse processo foi feito através da reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ciclagem térmica iniciou com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 36 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 48°C, 40 segundos a 68°C, e uma extensão final de 5 minutos a 68°C. Os produtos de PCR serão enviados para a empresa Macrogen para sequenciamento.

Resultados e Discussões

As sequências de DNA obtidas após o sequenciamento serão analisadas e editadas no Geneious v.9.1.6. Os alinhamentos vão ser realizados no mesmo programa, utilizando o algorítimo Muscle com suas configurações padrão. Seguindo o Critério de Informação Bayesiana, utilizaremos o modelo de substituição nucleotídica mais adequado aos dados para análises Bayesianas no Beast v.1.10.4 (Bouckaert et al. 2019), a fim de estabelecer as relações genealógicas. Nós descartaremos 20% das árvores iniciais mostradas como burn-in. O Tracer (Rambaut et al. 2018) vai ser utilizado para análise da convergência,

tendo em consideração o tamanho efetivo das amostras. No TreeAnnotator a árvore de máxima credibilidade será anotada e desenhada no FigTree (Rambaut 2018). Consideraremos como significativa a Probabilidade Bayesiana Posterior (PP) > 0,99 (Bouckaert et al. 2019). Além disso, análises de inferência filogenética por estimadores de Máxima Verossimilhança serão executadas utilizando o mesmo modelo de substituição de nucleotídeos no programa IQ-TREE (Minh et al. 2013). Com ás análises Espera-se que o processamento e a edição das sequências de DNA permitam obter um alinhamento de boa qualidade, garantindo a acurácia das análises subsequentes. A partir desse conjunto de dados, esperamos identificar o modelo de substituição nucleotídica ideal. Como resultado principal, espera-se a geração de árvores filogenéticas obtidas tanto por Inferência Bayesiana (BEAST) quanto por Máxima Verossimilhança (IQ-TREE), que explicitem a topologia evolutiva e confirmem a identidade molecular das espécies.

Para a validação dos resultados, será observada primeiramente a convergência das corridas Bayesianas no programa Tracer, assegurando que o descarte de 20% como burn-in tenha sido adequado e que os valores de Tamanho Efetivo da Amostra (ESS) superem 200 para os parâmetros analisados. Nas árvores anotadas e visualizadas no FigTree, observará se as amostras pertencentes aos mesmos táxons formam clados monofiléticos coesos, sustentados por alta Probabilidade Posterior (PP > 0,99) e valores equivalentes de suporte de bootstrap na análise de Máxima Verossimilhança. Adicionalmente, a topologia obtida permitirá observar possíveis divergências genéticas, indicando possível presença de espécies cripticamente relacionadas, linhagens evolutivas isoladas ou eventuais inconsistências na identificação morfológica prévia.

Conclusão

Embora a pesquisa ainda esteja em andamento, o trabalho até o momento proporcionou um aprendizado prático e teórico valioso sobre todas as etapas dos estudos moleculares. A experiência permitiu acompanhar o fluxo completo das amostras desde a coleta em campo e o armazenamento adequado até a rotina no laboratório , incluindo o manuseio de equipamentos, reagentes e o cumprimento de protocolos científicos padronizados. Além disso, foi possível consolidar na prática etapas essenciais da biologia molecular, como a extração de DNA, amplificação por PCR e purificação das amostras

Referências

Beckage, B., Osborne, B., Gavin, D.G., Pucko, C., Siccama, T. & Perkins, T. (2008) A rapid upward shift of a forest ecotone during 40 years of warming in the Green Mountains of Vermont. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 105, 4197–4202.

Butt, K.R., Briones, M.J.I. & Lowe, C.N. (2009) A etiquetagem de minhocas com implante visual de elastômero é uma técnica confiável? Pesquisa Agropecuária Brasileira, 44, 969–974.

Caetano, G.H.D.O. & Colli, G.R. (2021) Climate instability causing the decline of a Neotropical savanna lizard population (Squamata: Tropiduridae). Biological Journal of the Linnean Society, 134, 474–485.

Caldas, F.L.S., Costa, T.B., Laranjeiras, D.O., Mesquita, D.O. & Garda, A.A. (2016) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga V: Seridó Ecological Station (Rio Grande do Norte, Brazil). Check List, 12, 1929.

Castro, D.P., Mângia, S., Magalhães, F.M., Röhr, D.L., Camurugi, F., Rodrigues, R., . . . Borges-Nojosa, D.M. (2019) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga VI: The Ubajara National Park, Ceará, Brazil. Herpetology Notes, 12, 727–742.

Cavalcanti, L.B.Q., Costa, T.B., Colli, G.R., Costa, G.C., França, F.G.R., Mesquita, D.O., . . . Garda, A.A. (2014) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga II: Serra da Capivara National Park. Check List, 10, 18–27.

Cechin, S.Z. & Martins, M. (2000) Eficiência de armadilhas de queda (pitfall traps) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 17, 729-740.

Costa, B.M., Pantoja, D.L., Sousa, H.C., de Queiroz, T.A. & Colli, G.R. (2019) Long-term, fire-induced changes in habitat structure and microclimate affect Cerrado lizard communities. Biodiversity and Conservation, 29, 1659–1681.

Costa, T.B., Laranjeiras, D.O., Caldas, F.L.S., Santana, D.O., Silva, C.F., Alcântara, E.P., . . . Garda, A.A. (2018) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga VII: Aiuaba Ecological Station (Ceará, Brazil). Herpetology notes, 11, 929–941.

Diele-Viegas, L.M., Figueroa, R.T., Vilela, B. & Rocha, C.F.D. (2020) Are reptiles toast? A worldwide evaluation of Lepidosauria vulnerability to climate change. Climatic Change, 159, 581–599.

Easterling, D.R., Meehl, G.A., Parmesan, C., Changnon, S.A., Karl, T.R. & Mearns, L.O. (2000) Climate extremes: observations, modeling, and impacts. Science, 289, 2068–2074.

Freire, E.M.X. (1996) Estudo ecológico e zoogeográfico sobre a fauna de lagartos (Sauria) das dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraiba, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, 13, 903–921.

Garda, A.A., Wiederhecker, H.C., Gainsbury, A.M., Costa, G.C., Pyron, R.A., Vieira, G.H.C., . . . Colli, G.R. (2013a) Microhabitat variation explains local-scale terrestrial species distributions and abundances in an Amazonian lizard assemblage. Biotropica, 45, 245–252.

Garda, A.A., Costa, T.B., Santos-Silva, C.R., Mesquita, D.O., Faria, R.G., Conceicão, B.M., . . . Torquato, S. (2013b) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga I: Raso da Catarina Ecological Station. Check List, 9, 405–414.

Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., . . . Winne, C.T. (2000) The global decline of reptiles, déjà Vu amphibians. Bioscience, 50, 653–666.

Gotelli, N.J. & Colwell, R.K. (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. Ecology Letters, 4, 379–391.

Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.-A.C. & Foster, M.S. (1994) Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington.

Leal, M.E., Barbosa, A.S. & Schulz, U.H. (2012) Uso de implante visual fluorescente de elastômero (VIFE) na marcação de pequenos peixes de água doce tropicais. Biotemas, 25

Lion, M.B., Garda, A.A. & Fonseca, C.R. (2014) Split distance: a key landscape metric shaping amphibian populations and communities in forest fragments. Diversity and Distributions, 20, 1245-1257.

Lion, M.B., Garda, A.A., Santana, D.J. & Fonseca, C.R. (2016) The conservation value of small fragments for Atlantic Forest reptiles. Biotropica, 48, 265–275.

Magalhães, F.M., Laranjeiras, D.O., Costa, T.B., Juncá, F.A., Mesquita, D.O., Röhr, D.L., . . . Garda, A.A. (2015) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga IV: Chapada Diamantina National Park, Bahia, Brazil. Herpetology Notes, 8, 243–261.

Magalhães, F.M., Dantas, A.K.B.P., Brito, M.R.M., Medeiros, P.H.S., Oliveira, A.F., Pereira, T.C.S.O., . . . Garda, A.A. (2013) Anurans from an Atlantic Forest-Caatinga ecotone in Rio Grande do Norte State, Brazil. Herpetology Notes, 6, 1–10.

Pedrosa, I.M.M.C., Costa, T.B., Faria, R.G., França, F.G.R., Laranjeiras, D.O., Oliveira, T.C.S.P., . . . Garda, A.A. (2014) Herpetofauna of protected areas in the Caatinga III: The Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. Biota Neotropica, 14, 1–12.

Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., . . . Young, B.e. (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. Nature, 439, 161-167.

Prado, D.E. (2003) As Caatingas da América do Sul. Ecologia e Conservação da Caatinga (ed. by I.R. Leal, M. Tabarelli and J.M.C. Silva), pp. 3–73. Ed. Universitária da UFPE, Recife.

Santana, D.J., Mângia, S., Silveira-Filho, R.R., Barros, L.C.S., Andrade, I., Napoli, M.F., . . . Garda, A.A. (2015) Anurans from the middle Jaguaribe River region, Ceará State, Northeastern Brazil. Biota Neotropica, 15, 1–8.

Silva, J.M.C., Barbosa, L.C.F., Leal, I.R. & Tabarelli, M. (2017) The Caatinga: Understanding the Challenges. Biodiversity, Ecosystems Services and Sustainable Development in Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America (ed. by J.M.C. Silva, I. Leal and M. Tabarelli), pp. 3–19. Springer-Verlag, Berlin.

Sinervo, B., Mendez-de-la-Cruz, F., Miles, D.B., Heulin, B., Bastiaans, E., Cruz, M.V.S., . . . Sites, J.W. (2010) Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. Science, 328, 894–899.

Vitt, L.J., Caldwell, J.P., Wilbur, H.M. & Smith, D.C. (1990) Amphibians as the harbingeers of decay. Bioscience, 40, 418.

CÓDIGO: SB0340

AUTOR: ELAYNE CRISTINA RODRIGUES DIAS

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Explorando o uso de polissacarídeos sulfatados de algas verdes na Inibição da adipogênese em células tronco estromais humanas

Resumo

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo aumento da massa adiposa. Diante das limitações farmacológicas, os polissacarídeos sulfatados (PS) de macroalgas marinhas destacam-se como alternativas promissoras por suas propriedades antiadipogênicas em modelos experimentais. Entretanto, não existem estudos sobre os efeitos dos PS da alga verde *Caulerpa cupressoides var. flabellata* em células estromais mesenquimais humanas da geleia de Wharton (hCEM-GW). Em estudo anterior, o extrato total (ET) e as frações F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0 não apresentaram citotoxicidade em hCEM-GW, e um screening preliminar indicou efeito antiadipogênico, sobretudo para as amostras F0.5 e F1.0. Neste trabalho, o screening foi repetido com hCEM-GW cultivadas por 21 dias com ET e frações (5, 10, 25 e 50 µg/mL), avaliando-se o acúmulo lipídico por Oil Red O. Não foram observadas diferenças significativas entre os controles negativo e positivo, impossibilitando a validação do ensaio com os PS. Diante disso, foi realizado um estudo a fim de otimizar a adipogênese em hCEM-GW, foram usados dois meios de indução adipogênica, contendo indometacina ou 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX), para definir o mais adequado. Foi observado que o meio com IBMX promoveu alterações morfológicas mais evidentes, sugerindo maior capacidade de indução adipogênica em hCEM-GW. É necessário repetir a otimização do protocolo para viabilizar a continuidade da avaliação do potencial antiadipogênico dos PS de *C. cupressoides.*

Palavras-chave: Obesidade. Macroalgas. Adipogênese. hCEM-GW. Caulerpa cupressoides.

TITLE: Investigation of the reproducibility of the anti-adipogenic effect of Caulerpa cupressoides polysaccharides and optimization of the differentiation protocol in hWJ-MSCs.

Abstract

Obesity is a chronic disease characterized by increased adipose mass. Given the limitations of pharmacological treatments, sulfated polysaccharides (SPs) from marine macroalgae have emerged as promising alternatives due to their anti-adipogenic

properties in experimental models. However, no studies have investigated the effects of SPs from the green alga *Caulerpa cupressoides var. flabellata* on human mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly (hWJ-MSCs). In a previous study, the total extract (TE) and fractions F0.3, F0.5, F1.0, and F2.0 showed no cytotoxicity in hWJ-MSCs, and preliminary screening indicated an anti-adipogenic effect, particularly for F0.5 and F1.0. In the present study, screening was repeated hWJ-MSCscultured for 21 days with TE and fractions (5, 10, 25, and 50 µg/mL), and lipid accumulation was assessed using Oil Red O staining. No significant differences were observed between the negative and positive controls, preventing validation of the assay with the SPs. Therefore, a study was conducted to optimize adipogenesis in hWJ-MSCs using two adipogenic induction media containing either indomethacin or 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) to determine the most suitable condition. The IBMX-containing medium induced more pronounced morphological changes, suggesting a greater adipogenic induction capacity in hWJ-MSCs. Further optimization of the protocol is necessary to enable continued evaluation of the anti-adipogenic potential of SPs from *C. cupressoides.*

Keywords: Obesity. Macroalgae. Adipogenesis. hWJ-MSCs. Caulerpa cupressoides.

Introdução

A obesidade consiste em uma enfermidade crônica de origem multifatorial, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo capaz de comprometer a saúde. Diante do aumento expressivo de sua ocorrência em escala mundial, torna-se cada vez mais necessária a adoção de estratégias terapêuticas mais efetivas (LINGVAY *et al*., 2024). Dentre as estratégias existentes, diferentes abordagens farmacológicas têm sido empregadas para favorecer a redução do peso corporal. Esses medicamentos atuam por mecanismos distintos, como o bloqueio da lipase pancreática, a ativação dos receptores do peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1), que reduz a ingestão alimentar, e a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina. Apesar de sua utilização clínica, essas terapias podem estar associadas a efeitos adversos, incluindo pancreatite, esteatorreia, náuseas, constipação, xerostomia e insônia, além de apresentarem eficácia variável na redução do tecido adiposo (CHAVES FILHO *et al*., 2022; GASMI et al., 2023).

Diante das limitações associadas às terapias disponíveis, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes que apresentem menor ocorrência de efeitos adversos continua muito relevante. Nesse cenário, compostos bioativos provenientes de plantas, frutas e algas marinhas vêm sendo investigados em razão de seu potencial na regulação do peso corporal (DAS et al., 2025). Entre essas biomoléculas, destacam-se os polissacarídeos sulfatados (PS) obtidos de macroalgas marinhas, que apresentam caráter renovável e diversas propriedades biológicas, como atividades anticoagulante, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena, além da capacidade de atuar na modulação de diferentes vias celulares (ZAITSEVA *et al*., 2022; NAGAHAWATTA *et al*., 2023). Os PS encontrados em algas marrons, vermelhas e verdes apresentam ampla diversidade estrutural, que pode variar de acordo com a espécie e a região da alga em que são encontrados (CHAVES FILHO *et al*., 2022). Entre esses grupos, os PS provenientes de

algas verdes apresentam maior heterogeneidade estrutural e permanecem menos explorados cientificamente (CHAVES FILHO *et al*., 2018), reforçando a importância de ampliar as investigações sobre suas propriedades biológicas.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que os PS obtidos das macroalgas *Caulerpa prolifera* e *Caulerpa sertularioides* apresentam efeitos antilipogênico e antiadipogênico em diferentes modelos experimentais, incluindo o nematoide *Caenorhabditis elegans* e pré-adipócitos murinos da linhagem 3T3-L1, respectivamente (CHAVES FILHO *et al.*, 2020, 2022). Entretanto, os efeitos dos PS de *Caulerpa cupressoides* ainda não haviam sido investigados em células estromais mesenquimais humanas da geleia de Wharton (hCEM-GW), evidenciando uma lacuna quanto ao potencial desses compostos na modulação da adipogênese em um modelo celular humano.

Em etapa preliminar, o extrato total (ET) e as frações ricas em PS de *C. cupressoides* não apresentaram citotoxicidade e demonstraram possível efeito antiadipogênico, com destaque para as amostras F0.5 e F1.0. Entretanto, por se tratar de um único ensaio, tornou-se necessária a repetição do experimento para verificar a reprodutibilidade dos resultados, além da avaliação de diferentes meios de indução para estabelecer um protocolo de adipogênese adequado e reprodutível para as hCEM-GW como modelo. Assim, este trabalho deu continuidade à investigação do potencial antiadipogênico dos PS, buscando otimizar as condições experimentais para sua avaliação.

Metodologia

Obtenção das amostras:

A espécie de alga verde *C. cupressoides var. flabellata* utilizada neste estudo foi coletada no litoral do Rio Grande do Norte. A identificação do material, bem como os processos de secagem, despigmentação e obtenção dos polissacarídeos sulfatados (PS) por precipitação com solvente orgânico, foram realizados em etapas anteriores da pesquisa e descritas por Farias *et al*. (2025).

Obtenção e manutenção das hCEM-GW:

As hCEM-GW utilizadas no estudo foram provenientes de cordões umbilicais coletados após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido pelas mães, seguindo os princípios estabelecidos pela Convenção de Helsinque e as normas dos Comitês de Ética

Nacional e Local (nº 508.459). As células foram isoladas a partir da geleia de Wharton e caracterizadas de acordo com o protocolo descrito em RODRIGUES, V. M. *et al.* (2026). Após o isolamento, as células foram mantidas em αMEM (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (10.000 U/mL de penicilina G e 25 µg/mL de estreptomicina; Gibco) e 1% de L-glutamina (Gibco). As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2, com renovação do meio a cada dois ou três dias (CHAVES FILHO *et al*., 2022).

Para a realização dos ensaios, as células foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 5 × 10^3 células por poço até atingirem aproximadamente 80% de confluência, quando foram submetidas aos meios de diferenciação adipogênicos e aos tratamentos experimentais.

Avaliação comparativa do efeito de dois meios distintos na diferenciação adipogênica de hCEM-GW:

As células foram submetidas a dois protocolos de diferenciação adipogênica, denominados M1 e M2, elaborados como adaptações de protocolos previamente descritos para células estromais mesenquimais humanas. Ambos os meios foram preparados com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos, 1 µM de dexametasona e 5 µg/mL de insulina, diferindo apenas quanto ao indutor adipogênico empregado. O meio M1 foi elaborado como uma adaptação do protocolo descrito por Kulebyakin *et al*. (2021), dessa forma, o indutor utilizado no presente estudo foi a indometacina na concentração de 100 µM. Já o meio M2 foi elaborado como uma adaptação do protocolo descrito por Heimann *et al*. (2023), mantendo como agente indutor apenas 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX) a concentração de 0,5 mM.

Como controle negativo, foram utilizadas células mantidas em meio basal constituído por DMEM (Gibco, EUA) suplementado com 10% de SFB, 1% de antibióticos (10.000 U/mL de penicilina G e 25 µg/mL de estreptomicina; Gibco) e 1% de L-glutamina (Gibco).

As células permaneceram em cultivo por 21 dias, com renovação dos meios a cada 2 ou 3 dias. Ao final do período de indução, a diferenciação adipogênica foi avaliada qualitativamente por meio da análise das alterações morfológicas e do acúmulo de lipídios intracelulares.

Avaliação da atividade antiadipogênica das amostras ricas em PS em hCEM-GW:

As células foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 5 × 10^3 células por poço, em meio basal. Quando as hCEM-GW atingiram 80% de confluência, o meio foi trocado para os tratamentos experimentais. Neste ensaio, foi utilizado o meio M1 para a indução adipogênica. O M1 foi suplementado com as amostras de PS (extrato total, F0.3,

F0.5, F1.0 e F2.0) nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 µg/mL. As células mantidas exclusivamente no meio indutor, sem PS, constituíram o controle positivo, enquanto aquelas cultivadas apenas em meio basal foram utilizadas como controle negativo. O período de cultivo foi de 21 dias, com renovação do meio a cada 2 ou 3 dias. Ao final do período de indução, a diferenciação adipogênica foi avaliada qualitativamente, por meio da análise das alterações morfológicas, e quantitativamente, por meio da leitura espectrofotométrica do Oil Red O.

Avaliação da adipogênese por coloração com Oil Red O:

A diferenciação adipogênica das hCEM-GW foi avaliada por meio da coloração com Oil Red O a 0,2% (Sigma-Aldrich), utilizando uma adaptação dos protocolos descritos por Chaves Filho *et al*. (2020, 2022). Ao final do período de indução, as culturas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após a remoção do fixador, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e incubadas com a solução de Oil Red O a 0,2% por 20 minutos, em temperatura ambiente, sem agitação e protegidas da luz. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS para remoção do excesso de corante.

A avaliação qualitativa da diferenciação adipogênica foi realizada por microscopia óptica invertida. A análise quantitativa foi realizada extraindo o Oil Red O retido pelas células com isopropanol a 100%, seguido da leitura de absorbância por espectrofotometria a 520 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle positivo.

Análise estatística:

A análise estatística foi conduzida por ANOVA, seguida do teste de Dunnett, com nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.01; GraphPad Software, Inc.).

Resultados e Discussões

Avaliação qualitativa de meio alternativo para indução da adipogênese em hCEM-GW:

Diante da ausência de reprodutibilidade dos resultados do segundo screening das frações ricas em PS, levantou-se a hipótese de que o protocolo empregado para indução da adipogênese em hCEM-GW necessitava de otimização, a fim de possibilitar uma avaliação válida dos possíveis efeitos dos PS nesse modelo celular. Assim, foi realizado

um novo ensaio, sem a aplicação das amostras ricas em PS, exclusivamente para avaliar e comparar as condições de indução da adipogênese e identificar o protocolo mais adequado para o estudo do efeito dos PS sobre a adipogênese desse modelo celular. Então, as células hCEM-GW foram cultivadas por 21 dias em dois meios de diferenciação contendo indometacina (M1) ou IBMX (M2). A análise das imagens das células e de sua morfologia após coloração com Oil Red O (Fig. 1) indicou que o meio M2 promoveu maior número de células com características compatíveis com a diferenciação adipogênica, evidenciadas por células mais arredondadas e com notórias gotículas lipídicas intracelulares acumuladas (coradas em vermelho), características semelhantes às observadas durante a diferenciação de células adipogênicas in vitro (HERBERS *et al.*, 2022). No meio M1, as células também apresentaram coloração avermelhada, porém sua morfologia permaneceu mais semelhante à observada no controle negativo. Em conjunto, essas observações sugerem que o meio M2 apresentou maior potencial para indução da diferenciação adipogênica nas condições avaliadas. Entretanto, os resultados são preliminares, uma vez que foram obtidos em um único experimento que não foi normalizado pela quantificação de proteína. Assim, são necessárias repetições experimentais independentes e a quantificação do acúmulo lipídico por Oil Red O, com normalização pelo conteúdo proteico, para confirmar a maior eficiência do meio M2.

Reavaliação da atividade antiadipogênica das amostras ricas em PS em hCEM-GW e reprodutibilidade do ensaio:

O efeito antiadipogênico do ET e das frações (F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0) ricas em PS, nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL, em hCEM-GW foi reavaliado pela repetição de um ensaio previamente realizado. Diferentemente do primeiro teste, não foi observada diferença estatística entre os controles positivo (células mantidas em meio suplementado com indutores adipogênicos) e negativo (células mantidas em meio sem indutores adipogênicos) deste estudo (Fig. 2). Esses resultados dos controles invalidaram o ensaio e comprometeram sua utilização como referências experimentais, além de impossibilitarem uma avaliação confiável do efeito das amostras sobre o acúmulo lipídico. Embora algumas amostras tenham apresentado menor densidade óptica que os controles, esse resultado não pode ser atribuído diretamente a um efeito antiadipogênico, pois os controles não apresentaram o comportamento esperado. Vale ressaltar ainda que a ausência de normalização pela quantidade de células limita a interpretação, uma vez que as diferenças na coloração podem estar relacionadas à densidade celular e ao conteúdo lipídico.

Conclusão

Os resultados obtidos até o momento não permitem estabelecer conclusões definitivas sobre o potencial antiadipogênico dos PS de *C. cupressoides* em células hCEM-GW, uma vez que a ausência de reprodutibilidade e de diferenças estatisticamente significativas entre os controles do segundo ensaio indicam que o modelo experimental ainda necessita

de ajustes metodológicos. Os ensaios de otimização demonstraram que o protocolo de indução influencia diretamente a qualidade da diferenciação adipogênica e indicaram que o meio contendo IBMX promove alterações morfológicas mais compatíveis com esse processo do que o meio contendo indometacina. Portanto, o presente estudo contribui como uma etapa exploratória ao evidenciar a necessidade de padronização do protocolo de diferenciação antes da continuidade das investigações sobre os efeitos biológicos desses polissacarídeos nesse modelo celular.

Referências

1. CHAVES FILHO, G. P. et al. Genotoxicity and osteogenic potential of sulfated polysaccharides from Caulerpa prolifera seaweed. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 565-571, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.132.
2. CHAVES FILHO, G. P. et al. Sulfated polysaccharides from green seaweed Caulerpa prolifera suppress fat accumulation. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 4299-4307, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s10811-020-02249-3.
3. CHAVES FILHO, G. P. et al. Sulfated glucan from the green seaweed Caulerpa sertularioides inhibits adipogenesis through suppression of adipogenic and lipogenic key factors. **Marine Drugs**, v. 20, n. 8, p. 470, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/md20080470.
4. DAS, M. et al. Metabolic regulation of obesity by naturally occurring compounds: mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in Endocrinology**, v. 16, 2025. DOI: https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1655875.
5. FARIAS, P. F. F. et al. Sulfated polysaccharides of Caulerpa cupressoides var. flabellata: an investigation into their antioxidant properties and biocompatibility. **Journal of Applied Phycology**, v. 37, p. 2829–2844, 2025. DOI: https://doi.org/10.1007/s10811-025-03539-4.
6. GASMI, A. et al. Pharmacological Treatments and Natural Biocompounds in Weight Management. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 212, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/ph16020212.
7. HEIMANN, M. et al. Optimizing the Adipogenic Induction Protocol Using Rosiglitazone Improves the Physiological Parameters and Differentiation Capacity of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Horses, Sheep, Dogs, Murines, and Humans. **Animals**, v. 13, n. 20, art. 3224, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/ani13203224.
8. HERBERS, E. et al. Preventing white adipocyte browning during differentiation in vitro: the effect of differentiation protocols on metabolic and mitochondrial phenotypes. **Stem Cells International**, v. 2022, artigo 3308194, 21 p., 2022. DOI: https://doi.org/10.1155/2022/3308194.
9. KULEBYAKIN, K. et al. Decreased Insulin Sensitivity in Telomerase-Immortalized Mesenchymal Stem Cells Affects Efficacy and Outcome of Adipogenic Differentiation in vitro. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, e662078, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662078.
10. LINGVAY, I. et al. Obesity in adults. **The Lancet**, v. 404, n. 10456, p. 972-987, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01210-8.
11. NAGAHAWATTA, D. P. et al. Functions and values of sulfated polysaccharides from seaweed. **Algae**, v. 38, n. 4, p. 217-240, 2023. DOI:

https://doi.org/10.4490/algae.2023.38.12.1.
12. RODRIGUES, Victor M. et al. Sulfated polysaccharides from Caulerpa sertularioides promote bone regeneration in hMSC-WJ and zebrafish models. **Algal Research**, v. 94, p. 104552, 2026. DOI: 10.1016/j.algal.2026.104552.
13. ZAITSEVA, O. O. et al. Seaweed sulfated polysaccharides and their medicinal properties. **Algal Research**, v. 68, p. 102885, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102885.
14. ZHANG, C. et al. Single-cell transcriptomic analysis reveals the cellular heterogeneity of mesenchymal stem cells. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 20, p. 70-86, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.01.005

Anexos



Figura 1 - Análise morfológica da diferenciação adipogênica de células hCEM-GW sob diferentes meios de indução.



Figura 2 - Avaliação do potencial antiadipogênico de polissacarídeos sulfatados de Caulerpa cupressoides em células hCEM-GW.

CÓDIGO: SB0350

AUTOR: KIVIA MILLANA DE SOUSA

ORIENTADOR: PAULO MARCOS DA MATTA GUEDES

TÍTULO: Avaliação da atividade inseticida do fluralaner (Exzolt) administrado em galinhas contra Triatoma infestans e Triatoma brasiliensis

Resumo

A permanência de triatomíneos no peridomicílio limita o controle vetorial da doença de Chagas e reforça a necessidade de estratégias complementares. Este estudo avaliou a intensidade e a duração da ação inseticida do fluralaner *(Exzolt®)* administrado a galinhas contra *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis*. Dezesseis aves foram distribuídas em quatro grupos (n = 4): controle não tratado e grupos que receberam duas administrações de 0,5, 2,5 ou 5,0 mg/kg. Ninfas de terceiro a quinto estádio realizaram repasto antes do tratamento e nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 e 77. A eficiência alimentar foi estimada pelo ganho de peso, e a mortalidade foi registrada durante sete dias. O tratamento não alterou o sucesso alimentar, e não foram observados efeitos adversos nas aves. Ambas as espécies apresentaram 100% de mortalidade até o 14º dia com 0,5 mg/kg e até o 28º dia com 2,5 e 5,0 mg/kg. Com 2,5 mg/kg, a atividade significativa persistiu até o 56º dia para *T. infestans* e até o 35º dia para *T. brasiliensis*; com 5,0 mg/kg, permaneceu até o 56º dia para ambas. As doses superiores foram mais eficazes do que a dose recomendada pelo fabricante. Os resultados demonstram que o tratamento sistêmico de galinhas com fluralaner pode transformar uma fonte alimentar frequente no peridomicílio em um repasto letal, indicando potencial como ferramenta complementar no controle dos vetores da doença de Chagas.

Palavras-chave: Fluralaner. Triatoma infestans. Triatoma brasiliensis. Galinhas.

TITLE: Insecticidal activity of fluralaner (Exzolt) administered to chickens against Triatoma infestans and Triatoma brasiliensis

Abstract

The persistence of triatomines in peridomestic settings limits Chagas disease vector control and highlights the need for complementary strategies. This study assessed the magnitude and duration of the insecticidal activity of fluralaner (Exzolt®) administered to chickens against *Triatoma infestans* and *Triatoma brasiliensis*. Sixteen birds were allocated to four groups (n = 4): an untreated control and groups receiving two administrations of 0.5, 2.5 or 5.0 mg/kg. Third- to fifth-instar nymphs fed on the birds before treatment and on days 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 and 77. Feeding efficiency was estimated from nymphal weight gain, and mortality was recorded for seven days. Treatment did not affect feeding success, and no adverse effects were observed in the birds. Both species exhibited 100% mortality through day 14 with 0.5 mg/kg and through day 28 with 2.5 and 5.0 mg/kg. With 2.5 mg/kg, significant insecticidal activity persisted through day 56 for *T. infestans* and day 35 for *T. brasiliensis*; with 5.0 mg/kg, it persisted through day 56 for both species. The higher doses were more effective than the manufacturer-recommended dose. These results demonstrate that systemic treatment of chickens with fluralaner can turn a common peridomestic blood source into a lethal blood meal, supporting its potential as a complementary tool for Chagas disease vector control.

Keywords: Fluralaner. Triatoma infestans. Triatoma brasiliensis. Chickens.

Introdução

A doença de Chagas é uma enfermidade parasitária negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que aproximadamente oito milhões de pessoas estejam infectadas no mundo e que mais de 100 milhões permaneçam sob risco de infecção. Embora existam diferentes vias de transmissão, o contato com fezes ou urina de triatomíneos infectados continua epidemiologicamente relevante nas áreas endêmicas da América Latina. Como ainda não existe vacina, a redução do contato entre seres humanos e vetores permanece como uma das principais medidas preventivas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2026).

Entre os vetores de *T. cruz*i, Triatoma infestans apresenta elevada importância histórica e epidemiológica nos países do Cone Sul, enquanto Triatoma brasiliensis ocupa posição de destaque no Brasil, especialmente nas áreas semiáridas do Nordeste (QUEIROGA et al., 2021; PEREIRA et al., 2024). O controle desses insetos é realizado principalmente pela aplicação de piretroides de ação residual em domicílios e estruturas próximas. Apesar dos avanços obtidos com essa estratégia, a ocorrência de reinfestações e a presença de populações resistentes podem reduzir sua efetividade. Falhas associadas à resistência de *T. infestans* foram registradas na região do Gran Chaco, enquanto a recuperação da infestação por *T. brasiliensis* após a pulverização demonstra a dificuldade de manter o peridomicílio livre de vetores (BUSTAMANTE GOMEZ; DIOTAIUTI; GORLA, 2016; BEZERRA et al., 2020). Galinheiros e outras estruturas peridomiciliares oferecem abrigo e acesso frequente a fontes sanguíneas, favorecendo a permanência e a reprodução de triatomíneos próximos às residências (PEREIRA et al., 2024). A origem do repasto interfere

em parâmetros biológicos desses insetos, e tanto *T. infestans* quanto *T. brasiliensis* conseguem alimentar-se e completar seu desenvolvimento utilizando sangue de aves (GUARNERI; PEREIRA; DIOTAIUTI, 2000). Essa relação ecológica permite explorar as próprias galinhas como alvo de tratamento sistêmico: ao ingerir sangue de uma ave medicada, o triatomíneo também é exposto ao composto inseticida.

O fluralaner pertence à classe das isoxazolinas e atua principalmente sobre canais de cloro regulados pelo ácido gama-aminobutírico e pelo glutamato no sistema nervoso dos artrópodes. A inibição desses canais compromete a neurotransmissão, produzindo efeito inseticida e acaricida (GASSEL et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que o tratamento sistêmico de cães com fluralaner causa mortalidade prolongada de T. brasiliensis e de populações de *T. infestans,* inclusive resistentes a piretroides (QUEIROGA et al., 2021; GÜRTLER et al., 2022). Em galinhas, a administração de Exzolt® também apresentou atividade contra diferentes espécies de triatomíneos, indicando que aves tratadas podem funcionar como fontes de repasto letais no peridomicílio (PEREIRA et al., 2024). Diante da necessidade de ampliar a duração desse efeito e estabelecer esquemas de tratamento mais eficazes, o presente estudo avaliou a atividade inseticida do fluralaner (Exzolt®), administrado a galinhas em diferentes doses, contra *T. infestans e T. brasiliensis*. Também foram analisados o sucesso alimentar dos insetos, a persistência da mortalidade ao longo do período experimental e a ocorrência de efeitos adversos nas aves.

Metodologia

O estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Para os bioensaios, foram utilizadas ninfas de *Triatoma infestans e Triatoma brasiliensis* provenientes de colônias mantidas no laboratório. As colônias de *T. brasiliensis* tiveram origem em espécimes coletados nos municípios de Serra Negra do Norte e Caraúbas, no Rio Grande do Norte, enquanto as de T. infestans foram originadas de insetos procedentes de Espinosa e Bambuí, em Minas Gerais, cedidos pelo Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG).

Os triatomíneos eram livres de infecção por *Trypanosoma cruzi* e foram mantidos em insetário a 28 °C, em ambiente escuro e com umidade relativa aproximada de 60%. Foram selecionadas ninfas de terceiro, quarto e quinto estádios, alimentadas previamente e submetidas a um período de jejum de aproximadamente 20 dias antes dos ensaios. Foram incluídas 16 galinhas adultas *(Gallus gallus domesticus*), sem raça definida e com idades entre um e três anos, provenientes de uma propriedade particular localizada em Parnamirim, Rio Grande do Norte. As aves foram alojadas em grupos de quatro, em gaiolas separadas, com fornecimento de água e ração à vontade. Para evitar interferências sobre os resultados, foram utilizadas aves que não haviam

recebido inseticidas e cujos locais de criação também não haviam sido tratados com esses produtos nos 12 meses anteriores ao experimento.

Após a pesagem, as galinhas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, com quatro animais cada. O grupo 1 permaneceu sem tratamento e foi utilizado como controle. Os grupos 2, 3 e 4 receberam, respectivamente, 0,5, 2,5 e 5,0 mg/kg de fluralaner (Exzolt®). Em todos os grupos tratados, o medicamento foi administrado duas vezes, com intervalo de sete dias entre as administrações. A solução comercial de fluralaner, na concentração de 10 mg/mL, foi diluída na água de bebida e disponibilizada às aves durante 24 horas. A quantidade do produto fornecida a cada grupo foi determinada a partir do peso corporal médio das galinhas e do consumo de água medido no dia anterior ao tratamento. Os bioensaios foram realizados antes da administração do fluralaner, considerado dia 0, e nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 e 77 após o tratamento. Em cada avaliação, dez ninfas de *T. infestans* e dez ninfas de *T. brasiliensis*, pertencentes ao terceiro, quarto ou quinto estádio, foram colocadas para se alimentar em cada galinha. As aves foram posicionadas lateralmente em caixas plásticas escuras e contidas cuidadosamente com gaze, reduzindo sua movimentação durante o procedimento. Para o repasto, os insetos foram acondicionados em recipientes plásticos de 50 mL, fechados com tela fina e mantidos em contato com a região localizada abaixo das asas durante 30 minutos. Cada grupo de ninfas foi pesado imediatamente antes e após o repasto sanguíneo. O sucesso alimentar foi estimado pela razão entre o peso obtido depois da alimentação e o peso registrado antes do contato com a ave, permitindo determinar o aumento relativo da massa corporal. Ao término do repasto, as ninfas não alimentadas foram separadas, enquanto os insetos ingurgitados foram encaminhados ao insetário e mantidos a 28 °C, no escuro e sob umidade controlada. A sobrevivência foi verificada diariamente durante sete dias, registrando-se o número de indivíduos vivos e mortos de cada espécie, grupo de tratamento e período avaliado. Durante os 77 dias de acompanhamento, as galinhas foram observadas quanto à ocorrência de alterações clínicas ou comportamentais associadas ao tratamento.

Foram avaliados atividade geral, ingestão de água e alimento, dificuldade respiratória, alterações de locomoção, tremores, convulsões, paralisia, diarreia, coloração das mucosas e sinais de desidratação. O acompanhamento foi diário nos sete primeiros dias posteriores ao tratamento e, depois desse período, realizado semanalmente. O peso corporal das aves foi registrado sete dias antes do tratamento e nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 e 77. A atividade inseticida foi determinada pela comparação da mortalidade dos triatomíneos alimentados nas aves tratadas com a mortalidade observada no grupo-controle. As diferenças entre os tratamentos, as espécies e os períodos experimentais foram examinadas por modelo linear generalizado misto para medidas repetidas, considerando como efeitos o tratamento, o tempo, a espécie, a eficiência alimentar e suas interações. Nas comparações múltiplas, foi aplicada a correção de Bonferroni.

A eficiência alimentar foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, e a relação entre a quantidade de sangue ingerida e a mortalidade foi avaliada pela correlação de Spearman. As análises foram realizadas nos programas SPSS, versão 20.0, e GraphPad Prism, versão 10, adotando-se nível

de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram as normas brasileiras de cuidado e uso de animais em pesquisa e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN, sob o protocolo nº 039/2023.

Resultados e Discussões

Os resultados completos do experimento, incluindo a avaliação de outras espécies de triatomíneos, foram publicados por Pereira et al. (2026). Para este relatório, foram considerados apenas os dados de $Triatoma\ infestans$ e $Triatoma\ brasiliensis$, em conformidade com o plano de trabalho. Antes da administração do fluralaner, não foi registrada mortalidade entre as ninfas utilizadas nos bioensaios. Da mesma forma, os insetos alimentados nas aves do grupo-controle permaneceram vivos durante os sete dias de acompanhamento após cada repasto. Esse resultado indicou que as condições de contenção, alimentação e manutenção no insetário não foram responsáveis pela morte dos triatomíneos, permitindo atribuir a mortalidade observada nos grupos tratados à exposição sistêmica ao fluralaner. Também não foram identificadas alterações clínicas ou comportamentais nas galinhas que receberam 0,5, 2,5 ou 5,0 mg/kg de Exzolt® durante os 77 dias de observação.

As aves mantiveram atividade, ingestão de água e alimento e comportamento compatíveis com a normalidade, sem ocorrência de sinais neurológicos, respiratórios ou digestivos associados ao tratamento. A administração do medicamento também não interferiu no repasto das duas espécies. Considerando todos os períodos avaliados, o aumento médio do peso corporal das ninfas de $Triatoma\ infestans$ foi de 2,72 ± 1,18; 2,65 ± 0,92 e 2,71 ± 0,99 vezes nos grupos tratados com 0,5, 2,5 e 5,0 mg/kg, respectivamente, enquanto no grupo-controle o aumento foi de 2,81 ± 0,82 vezes. Para $Triatoma\ brasiliensis$, os valores correspondentes foram de 1,96 ± 1,03; 1,94 ± 0,67 e 2,11 ± 0,68 vezes nos grupos tratados e de 2,00 ± 0,67 vezes no controle. Não houve diferença entre os níveis de ingurgitamento dos insetos alimentados nas aves tratadas e não tratadas ($p = 1,000$). Portanto, o fluralaner não comprometeu o repasto nem o ingurgitamento dos triatomíneos nas condições experimentais empregadas.

Na dose recomendada pelo fabricante, de 0,5 mg/kg, foram observados 100% de mortalidade de $T.\ infestans$ e $T.\ brasiliensis$ nos dias 1, 7 e 14 após o tratamento. Depois desse período, ocorreu diminuição progressiva da atividade inseticida. Para $T.\ infestans$, a mortalidade permaneceu significativamente superior à condição anterior ao tratamento até o 28º dia ($p < 0,010$). Em $T.\ brasiliensis$, a diferença significativa foi mantida até o 21º dia ($p < 0,001$). Nos dias 35, 56 e 77, a mortalidade já não diferiu dos valores do grupo-controle. Esses dados demonstram que as duas espécies foram suscetíveis à dose de 0,5 mg/kg, embora $T.\ infestans$ tenha apresentado resposta residual por um período discretamente maior.

O aumento da dose prolongou tanto a mortalidade completa quanto a atividade residual do composto. Com duas administrações de 2,5 mg/kg, as duas espécies apresentaram 100% de mortalidade até o 28º dia. A atividade continuou estatisticamente significativa até o 56º dia para $T.\ infestans$ (p = 0,045) e até o 35º dia para $T.\ brasiliensis$ (p < 0,001). O grupo que recebeu 5,0 mg/kg também apresentou mortalidade de 100% até o 28º dia. Nessa dose, porém, a mortalidade permaneceu significativamente elevada até o 56º dia para as duas espécies, com p = 0,010 para $T.\ infestans$ e p = 0,004 para $T.\ brasiliensis$. Aos 77 dias, nenhum dos esquemas terapêuticos manteve atividade inseticida detectável.

Na comparação direta com 0,5 mg/kg, as doses de 2,5 e 5,0 mg/kg apresentaram maior eficácia para $T.\ infestans$ (p = 0,011 e p = 0,006, respectivamente) e para $T.\ brasiliensis$ (p < 0,001 para ambas as comparações). Por outro lado, não foi observada diferença global significativa entre os tratamentos com 2,5 e 5,0 mg/kg. Esse resultado indica que o aumento de 2,5 para 5,0 mg/kg não produziu ganho proporcional de eficácia. Para $T.\ infestans$, as duas doses superiores mantiveram atividade até o mesmo período. Em $T.\ brasiliensis$, o último momento com mortalidade significativamente elevada passou do 35º dia, com 2,5 mg/kg, para o 56º dia, com 5,0 mg/kg. Entretanto, essa diferença temporal deve ser interpretada com cautela, pois as avaliações foram realizadas em dias predeterminados e cada grupo continha apenas quatro aves. Assim, os resultados não permitem estabelecer o momento exato em que a concentração sanguínea deixou de ser letal.

O nível de ingurgitamento influenciou significativamente a mortalidade de $T.\ infestans$ (p = 0,037) e $T.\ brasiliensis$ (p = 0,043). Esse achado é biologicamente coerente com a ação sistêmica do fluralaner, pois a quantidade de medicamento ingerida depende do volume de sangue consumido pelo inseto. Nos períodos de maior atividade inseticida, as diferenças individuais no tamanho do repasto não impediram a ocorrência de mortalidade completa. À medida que a atividade residual diminuiu, a ingestão de maior volume sanguíneo passou a aumentar a probabilidade de exposição a uma dose letal. Dessa maneira, parte da variação observada nos períodos finais pode estar relacionada tanto à redução progressiva da concentração do fármaco nas aves quanto às diferenças de alimentação entre as ninfas.

A ausência de alteração no sucesso alimentar é relevante para a proposta de utilização do fluralaner como inseticida sistêmico. Caso o tratamento provocasse repelência ou impedisse o repasto, os triatomíneos poderiam continuar circulando no peridomicílio sem ingerir o composto. Neste estudo, as ninfas alimentaram-se de maneira semelhante nos grupos tratados e no controle, mas morreram após consumir o sangue das aves medicadas. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente após a administração de Exzolt® a galinhas, quando o tratamento com duas doses de 0,5 mg/kg não reduziu o ingurgitamento e provocou atividade inseticida contra $T.\ infestans$ e $T.\ brasiliensis$ por várias semanas (PEREIRA et al., 2024). A concordância entre os estudos reforça que a mortalidade decorre da exposição ao princípio ativo presente no sangue e não de alterações no comportamento alimentar.

O efeito obtido com 0,5 mg/kg também é compatível com experimentos realizados com outras apresentações de fluralaner. O tratamento sistêmico de galinhas com Bravecto® ocasionou mortalidade de triatomíneos por aproximadamente 14 dias (DURDEN et al., 2023), e atividade contra populações de $T.\ infestans$ resistentes a piretroides também foi demonstrada (ROCHA-BAZAN et al., 2025). Em cães, o fluralaner produziu mortalidade prolongada de $T.\ brasiliensis$ e contribuiu para reduzir a abundância de $T.\ infestans$ em cenários com resistência a inseticidas convencionais (QUEIROGA et al., 2021; GÜRTLER et al., 2022). Em conjunto, esses estudos sustentam a possibilidade de direcionar o tratamento ao hospedeiro utilizado como fonte sanguínea, atingindo o vetor durante o repasto.

O principal avanço observado neste trabalho foi o prolongamento do efeito obtido com as doses superiores. A mortalidade completa até o 28º dia representa o dobro do período alcançado com 0,5 mg/kg, que manteve 100% de mortalidade até o 14º dia. Além disso, a persistência de atividade significativa até o 56º dia demonstra que o fluralaner continuou presente em concentração capaz de afetar os triatomíneos mesmo depois de cessar a mortalidade total. A resposta rápida nas primeiras semanas é compatível com a ação das isoxazolinas sobre canais de cloro regulados pelo ácido gama-aminobutírico e pelo glutamato, cuja inibição compromete a neurotransmissão dos artrópodes (GASSEL et al., 2014).

A diferença observada entre as espécies, principalmente na dose mais baixa, pode decorrer de características próprias de $T.\ infestans$ e $T.\ brasiliensis$. Variações no volume de sangue ingerido em relação à massa corporal, na velocidade de absorção e metabolização do composto ou na sensibilidade dos canais nervosos podem modificar a quantidade necessária para produzir o efeito letal. No entanto, como esses mecanismos não foram avaliados diretamente, eles devem ser considerados hipóteses explicativas. O fato de 2,5 e 5,0 mg/kg produzirem mortalidade elevada nas duas espécies mostra que ambas são suscetíveis ao fluralaner e sugere que o aumento da exposição foi suficiente para reduzir parte da diferença interespecífica observada com 0,5 mg/kg.

Do ponto de vista epidemiológico, os achados são relevantes porque galinheiros constituem abrigos frequentes para triatomíneos no peridomicílio. O tratamento das aves transforma uma fonte alimentar que normalmente favoreceria a manutenção das colônias em um repasto capaz de provocar a morte dos insetos. Essa estratégia pode alcançar ninfas alojadas em frestas, pilhas de madeira, telhas e outras estruturas onde a pulverização residual apresenta menor alcance ou duração. Sua possível aplicação deve ser entendida como complementar ao controle químico convencional e à vigilância entomológica, especialmente em locais sujeitos à reinfestação ou à ocorrência de populações resistentes a piretroides.

Apesar dos resultados promissores, o estudo foi conduzido em condições controladas, com número reduzido de aves e utilização de ninfas provenientes de colônias laboratoriais. Em ambientes naturais, fatores como temperatura, disponibilidade de outras fontes sanguíneas, consumo irregular da água medicada e movimentação dos insetos podem alterar a efetividade do tratamento. Também foram avaliadas apenas ninfas de terceiro a quinto estádio,

não sendo possível afirmar que adultos e estádios ninfais iniciais apresentariam exatamente a mesma resposta. Além disso, a mortalidade foi acompanhada por sete dias após o repasto, sem avaliação de possíveis efeitos subletais sobre desenvolvimento, muda, fecundidade ou reprodução.

Embora não tenham sido observados efeitos adversos nas aves, esse resultado representa uma avaliação clínica realizada em 16 animais e não substitui estudos toxicológicos e farmacocinéticos. As doses de 2,5 e 5,0 mg/kg são superiores à recomendada pelo fabricante, tornando necessária a determinação de resíduos em ovos, carne e vísceras, bem como dos períodos adequados de carência, antes de qualquer utilização em comunidades rurais. A segurança do fluralaner administrado pela água de bebida já foi demonstrada em galinhas poedeiras em condições experimentais (PROHACZIK et al., 2017), mas a aplicação de esquemas com doses elevadas exige avaliação específica. A ausência de diferença global entre 2,5 e 5,0 mg/kg também indica que estudos com doses intermediárias podem identificar a menor concentração capaz de manter atividade prolongada, reduzindo custos e exposição desnecessária.

De modo geral, os resultados confirmam a atividade sistêmica do fluralaner contra $T.\ infestans$ e $T.\ brasiliensis$ e demonstram uma relação entre a dose administrada e a duração do efeito. As doses superiores ampliaram o período de mortalidade completa e mantiveram atividade residual por mais tempo do que 0,5 mg/kg, sem comprometer o repasto dos insetos ou provocar alterações clínicas detectáveis nas aves. Esses achados fornecem base para novos estudos de campo e para a definição de esquemas que conciliem eficácia entomológica, segurança dos animais, proteção dos consumidores e viabilidade operacional.

Conclusão

O fluralaner (Exzolt®), administrado pela água de bebida, apresentou atividade inseticida sistêmica contra $Triatoma\ infestans$ e $Triatoma\ brasiliensis$. Duas administrações de 0,5 mg/kg provocaram 100% de mortalidade nas duas espécies até o 14º dia, enquanto as doses de 2,5 e 5,0 mg/kg prolongaram a mortalidade completa até o 28º dia. A atividade residual de 2,5 mg/kg permaneceu significativa até o 56º dia para $T.\ infestans$ e até o 35º dia para $T.\ brasiliensis$. Com 5,0 mg/kg, o efeito foi mantido até o 56º dia para ambas as espécies.

As doses de 2,5 e 5,0 mg/kg foram superiores à dose recomendada pelo fabricante, mas não diferiram globalmente entre si, indicando que o aumento da dose não produziu ganho proporcional de eficácia. O tratamento também não comprometeu o repasto sanguíneo dos triatomíneos, condição importante para que eles ingerissem o composto, e não foram observadas alterações clínicas ou comportamentais nas aves durante os 77 dias de acompanhamento. Entretanto, a ausência de sinais adversos neste experimento não permite concluir que as

doses superiores sejam seguras para aplicação em campo ou para aves destinadas à produção de alimentos. Os resultados demonstram que galinhas tratadas com fluralaner podem funcionar como fontes de repasto letais para $T. infestans$ e $T. brasiliensis$. Dessa forma, o tratamento sistêmico das aves apresenta potencial para integrar estratégias complementares de controle da doença de Chagas em ambientes peridomiciliares, especialmente em locais sujeitos à reinfestação ou à resistência aos piretroides. Antes de sua aplicação em comunidades, ainda são necessários estudos de campo, avaliações de doses intermediárias e análises farmacocinéticas e de resíduos em ovos, carne e vísceras, com definição dos períodos adequados de carência.

Referências

BEZERRA, C. M. et al. Fast recovery of house infestation with Triatoma brasiliensis after residual insecticide spraying in a semiarid region of Northeastern Brazil. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 14, n. 7, e0008404, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008404.

BUSTAMANTE GOMEZ, M.; DIOTAIUTI, L.; GORLA, D. E. Distribution of pyrethroid resistant populations of Triatoma infestans in the Southern Cone of South America. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 3, e0004561, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004561.

GASSEL, M.; WOLF, C.; NOACK, S.; WILLIAMS, H.; ILG, T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 45, p. 111–124, 2014. DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.11.009.

GUARNERI, A. A.; PEREIRA, M. H.; DIOTAIUTI, L. Influence of the blood meal source on the development of Triatoma infestans, Triatoma brasiliensis, Triatoma sordida and Triatoma pseudomaculata (Heteroptera, Reduviidae). Journal of Medical Entomology, v. 37, n. 3, p. 373–379, 2000. DOI: 10.1093/jmedent/37.3.373.

GÜRTLER, R. E. et al. Treatment of dogs with fluralaner reduced pyrethroid-resistant Triatoma infestans abundance, Trypanosoma cruzi infection and human-triatomine contact in the Argentine Chaco. Parasites & Vectors, v. 15, art. 257, 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05343-2.

PEREIRA, L. C. et al. Insecticidal activity of fluralaner (Exzolt®) administered to Gallus gallus domesticus against triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Parasites & Vectors, v. 17, art. 208, 2024. DOI: 10.1186/s13071-024-06276-8.

PEREIRA, L. C. et al. Long-term efficacy of fluralaner (Exzolt®) in Gallus gallus domesticus against epidemiologically relevant triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): a potential complementary strategy for Chagas disease control. Parasites & Vectors, v. 19, art. 233, 2026. DOI: 10.1186/s13071-026-07382-5.

QUEIROGA, T. B. D. et al. Insecticidal efficacy of fluralaner (Bravecto®) against Triatoma brasiliensis, a major vector of Trypanosoma cruzi in Brazil. Parasites & Vectors, v. 14, art. 456, 2021. DOI: 10.1186/s13071-021-04978-x.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Geneva: WHO, 8 abr. 2026. Disponível em: WHO – Chagas disease. Acesso em: 28 ago. 2026.

Anexos



Figura 1 – Fluxograma do bioensaio para avaliação da atividade inseticida do fluralaner (Exzolt®) contra triatomíneos.



Figura 2 – O tratamento de galinhas com fluralaner (Exzolt®) não prejudica o sucesso alimentar dos triatomíneos.



Figura 3 – A mortalidade dos triatomíneos apresentou correlação positiva com o nível de ingurgitamento após o repasto em galinhas tratadas com fluralaner (Exzolt®).



Figura 4 – Atividade inseticida do fluralaner (Exzolt®), nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg, contra seis espécies de triatomíneos.



Figura 5 – Maior eficácia inseticida das doses de 2,5 e 5,0 mg/kg de fluralaner (Exzolt®) em comparação com a dose de 0,5 mg/kg.

CÓDIGO: SB0353

AUTOR: VITOR MONTEIRO OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: BRUNO CAVALCANTE BELLINI

TÍTULO: Descrição de nova espécie de Sminthurinus Börner (Collembola, Katiannidae) do Nordeste do Brasil: complementando estudo prévio para publicação dos dados

Resumo

Os colêmbolos são microartrópodes essenciais na ciclagem de nutrientes e decomposição de matéria orgânica no solo de diversos ecossistemas terrestres. O gênero *Sminthurinus* Börner, 1901, faz parte da família Katiannidae (Symphypleona) e está distribuído globalmente, porém até o momento contava com apenas duas espécies registradas no Brasil. Esse estudo visa descrever detalhadamente uma nova espécie desse gênero, *Sminthurinus* sp. nov., coletada em um pequeno fragmento de Mata Atlântica no município de Natal, Rio Grande do Norte. Os espécimes foram capturados através de armadilhas de queda (Pitfall Traps) e foram analisados sob microscopia óptica. Morfologicamente, a espécie é diagnosticada unicamente pelo complexo empodial II com unguículos bem desenvolvido, apêndice subanal da fêmea bifurcado, unguis com 2 dentes internos e mucro com ambas as lamelas serrilhadas. Difere-se das outras espécies brasileiras pela fórmula de tenent hairs clavados no tibiotarsos I-III e quetotaxia dorsal do dens com 12 cerdas. A descoberta e descrição dessa espécie representa o primeiro registro do gênero no Nordeste brasileiro, e reforça a relevância da taxonomia moderna em descrever espécies com base em quetotaxia detalhada. Além disso, esse estudo amplia substancialmente o conhecimento sobre a biodiversidade da fauna edáfica da região Neotropical.

Palavras-chave: Quetotaxia; Katiannoidea, Fauna edáfica; Região Neotropical; Taxonomia

TITLE: Description of a new species of Sminthurinus Börner (Collembola, Katiannidae) from Northeastern Brazil: complementing a previous study for data publication

Abstract

Springtails (Collembola) are essential microarthropods in nutrient cycling and soil organic matter decomposition across various terrestrial ecosystems. The genus *Sminthurinus* Börner, 1901 belongs to the family Katiannidae (Symphypleona) and is

globally distributed. However, to date, it had only two recorded species in Brazil. This study aims to describe in detail a new species of this genus, *Sminthurinus* sp. nov., collected in a small Atlantic Forest fragment in the municipality of Natal, Rio Grande do Norte. The specimens were collected using pitfall traps and analyzed under light microscopy. Morphologically, the species is uniquely diagnosed by the empodial complex II with well-developed unguiculi, a bifurcated female subanal appendage, an unguis with 2 inner teeth, and a mucro with both lamellae serrated. It differs from other Brazilian species by the formula of clavate tenent hairs on tibiotarsi I–III and a dorsal dental chaetotaxy with 12 chaetae. The discovery and description of this species represents the first record of the genus in Northeastern Brazil, and reinforces the relevance of modern taxonomy based on chaetotaxic traits. Furthermore, this study substantially expands the knowledge regarding the biodiversity of the edaphic fauna in the Neotropical region.

Keywords: Chaetotaxy; Katiannoidea; Edaphic fauna; Neotropical region; Taxonomy

Introdução

Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) são parte de um dos grupos de microartrópodes mais antigos, abundantes e bem-sucedidos, com registros fósseis que datam do período Devoniado. Apesar de originalmente reconhecidos como insetos basais e ápteros, estudos filogenéticos, ontogenéticos e morfológicos mostram que esses animais são hexápodes entognatos distintos da classe Insecta (HOPKIN, 1997; ZEPPELINI; BELLINI, 2004). Esse grupo de animais possui grande capacidade adaptativa e uma distribuição cosmopolita, habitando ambientes terrestres de todo o planeta, estando presentes desde a serrapilheira e o topo de florestas tropicais até regiões frias, desertos, cavernas e outros habitats associados ao solo e à vegetação.

A diversidade de colêmbolos é enorme, porém é considerada subestimada. São propriamente catalogadas mais de 9.600 espécies nominais em todo o mundo (BELLINGER; CHRISTIANSEN; JANSSENS, 1996-2024). Entretanto, a estimativa da riqueza real do grupo pode ser muito maior, podendo alcançar entre 50.000 e 500.000 espécies viventes (CICCONARDI ET AL, 2013). Há um claro déficit de conhecimento taxonômico na Região Neotropical. Atualmente, o Brasil possui 518 espécies registradas, a maioria com distribuição limitada ou registradas apenas para localidades específicas (ZEPPELINI ET AL. 2026). Porém, esse número certamente não reflete a real diversidade de espécies brasileiras, devido à escassez de taxonomistas especializados atuando na área, fato evidenciado pela concentração histórica dos estudos nas mesmas áreas geográficas do país (ZEPPELINI; QUEIROZ; BELLINI, 2023).

A Classe Collembola é dividida internamente em quatro grandes ordens: Poduromorpha, Entomobryomorpha, Symphypleona e Neelipleona (BELLINI; WEINER; WINCK, 2023). Diferentemente da anatomia corporal alongada dos Poduromorpha e Entomobryomorpha, os Symphypleona são caracterizados pelo corpo globoso, com a segmentação corporal pouco evidente, principalmente no abdome. Além disso, possuem antenas sempre mais longas que a cabeça (BELLINI ET AL., 2023; BRETFELD, 1999). A maioria dos Symphypleona possuem hábitos epiedáficos e

geralmente estão associados à vegetação, distintos pela mobilidade, apêndices bem desenvolvidos e padrões de pigmentação diversos (PETERSEN; LUXTON, 1982; POTAPOV ET AL., 2020).

A família Katiannidae (Symphypleona) abriga o gênero Sminthurinus Börner, 1901. As espécies desse gênero são caracterizadas especialmente por: Quarto segmento antenal liso, sem subdivisões ou anelações muito evidentes; terceiro segmento antenal com papila sensorial basal; múcron curto, geralmente com margem interna ondulada; sacos do tubo ventral lisos; e quetotaxia corporal e furcal importantes para a delimitação de espécies (BÖRNER, 1901; BRETFELD, 1999; PALACIOS-VARGAS; CAVAFLORES-ARGANDOÑA, 2020). No Brasil, este gênero ainda é pouco conhecido, e até o momento, com dois registros formais de espécies: *Sminthurinus* molinai Arlé, 1940, do Rio de Janeiro, e o *Sminthurinus* aureussetosus Bretfeld, 2002, do Amazonas (ARLÉ, 1940; BRETFELD, 2002).

Atualmente, dentro da sistemática de Collembola, o uso de características morfológicas detalhadas, especialmente a quetotaxia, é fundamental para a descrição correta de novas espécies, superando descrições antigas baseadas principalmente nos padrões de cor (DEHARVENG, 2004). A contínua descrição de novos táxons é essencial para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade e criar estratégias de conservação de ecossistemas frágeis ou ameaçados (BELLINI; WEINER; WINCK, 2023). Portanto, esse estudo visa descrever e ilustrar detalhadamente uma nova espécie do gênero *Sminthurinus* Börner encontrada no fragmento de Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Norte, complementando estudo prévio já realizado no laboratório, assim ampliando o conhecimento sobre a diversidade da ordem Symphypleona na Região Neotropical, se alinhando ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 15 (ODS 15) da Agenda 2030 da ONU.

Metodologia

Os espécimes de *Sminthurinu*s foram coletados no fragmento de Mata Atlântica, conhecido informalmente como Mata da CAERN (coordenadas 05°50’09.8”S; 35°12’15.3”W), no Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), localizado no município de Natal, Brasil. A área se trata de um remanescente florestal que pertencia ao Parque Estadual Dunas de Natal, porém, atualmente, tem sua vegetação em parte modificada por estar inclusa em um ambiente predominantemente urbano.

A coleta de colêmbolos foi feita no período diurno através do uso de armadilhas de queda (Pitfall Traps) no dia 25 de abril de 2022. As armadilhas foram deixadas no local por 48 horas, sendo coletadas no dia 27 de abril. Então, o resultado da coleta foi levado até o laboratório de Collembola da UFRN, onde foi propriamente etiquetado e preservado em recipientes contendo álcool etílico 70%.

Em laboratório, o material passou pelo processo de triagem inicial sob um microscópio estereoscópico Leica S8APO, com o auxílio de pissetas para a separação dos animais e placas de Petri. A análise microscópica foi feita a partir dos indivíduos selecionados e

submetidos a um processo de clarificação em líquido Nesbitt, lavados em líquido de Arlé, que possui a função de tampão, em seguida, foi realizada a montagem das lâminas semipermanentes utilizando o meio de Hoyer, seguindo os procedimentos propostos por Arlé e Mendonça (1982).

O estudo da morfologia e da quetotaxia foi realizado em um microscópio óptico Leica DM500. Os desenhos iniciais das estruturas morfológicas foram feitos inicialmente à mão, com grafite, através da câmara clara acoplada ao microscópio. Então, os desenhos foram revisados, vetorizados através do software CorelDraw v. 2022, e separados em pranchas. O habitus dos espécimes foi fotografado sob lupa Leica S8AP0, através do software LAS v. 4.12. O material-tipo analisado nesse estudo abrange o holótipo fêmea e sete parátipos fêmeas, e está depositado e tombado na Coleção de Collembola do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CC/UFRN).

Resultados e Discussões

Classe: Collembola Lubbock, 1870
Ordem: Symphypleona Börner, 1901
Superfamília: Katiannoidea Bretfeld, 1994
Família: Katiannidae Börner, 1913
Gênero: *Sminthurinus* Börner, 1901
Espécie-tipo: *Sminthurinus* niger, 1870

Diagnose do Gênero: Geralmente pigmentados, variando entre indivíduos de coloração amarelada com listras e manchas escuras até indivíduos completamente negros. Cabeça e corpo com cerdas regulares, ausência de espinhos grandes. Ant. IV simples, sem subdivisões evidentes ou anelações, possuindo ao menos o dobro do comprimento da Ant. III. Ant. III com papila sensorial basal simples ou com 2 a 4 vesículas. Peças bucais normais, sem modificações evidentes. Tricobótrias A-D presentes. Área parafurcal com presença de cerda neosminthuróide. Sacos eversíveis do colóforo lisos. Tenáculo com 4+4 dentes e 1 ou 2 cerdas no corpo. Abd. V fundido ou não ao pequeno abdome. Fêmeas com cerda a0 do Abd. VI geralmente bifurcada, cerdas circumanais aladas e expandidas na base. Apêndice subanal curvo ou bifurcado. Cerda metatrocanteral presente em um alvéolo alargado. Tibiotarsos com ou sem tenent hairs capitados, caso presentes variam de 4 a 5. Fúrcula com quetotaxia reduzida no dens. Mucro curto, geralmente com margem externa lisa e margem interna serrilhada, sem cerda mucroanal.

Sminthurinus sp. nov. Silva, Medeiros & Bellini

Material examinado. Holótipo fêmea: Brasil, Rio Grande do Norte, Natal, Campus Central da UFRN, fragmento de Mata Atlântica (Mata da CARN) (05°50’09.8”S;35°12’15.3”W), 25-27.iv.2022, Medeiros et al. Coll., armadilhas de queda (pitfall traps). Parátipos: 6 fêmeas, Brasil, Rio Grande do Norte, Natal, Campus Central da UFRN, fragmento de Mata Atlântica (Mata da CARN) (05°50’09.8”S; 35°12’15.3”W), 25-27.iv.2022, Medeiros et al. Coll., armadilhas de queda (pitfall traps). Material depositado na CC/UFRN.

Descrição. Comprimento do corpo (591 µm) mm. Comprimento da cabeça (111,15 µm). Comprimento da antena I (34,58 µm); comprimento da antena II (64,22 µm); comprimento da antena III (86,45 µm). Comprimento do unguis da perna I (29,64 µm); Comprimento do unguis da perna II (29,64 µm); Comprimento do unguis da perna III (29,64 µm). Comprimento do tibiotarso I (148,2 µm); Comprimento do tibiotarso II (160,55 µm); Comprimento do tibiotarso III (172,9 µm). Proporção do manúbrio: dens: mucro (1 : 2,29 : 0,91). Comprimento do Manúbrio (54,34 µm); Comprimento do Dens (124,5 µm); Comprimento do Mucro (49,4 µm). Espécimes com cor de fundo alaranja, com cabeça com manchas e linhas laterais longitudinais em azul escuro. Grande abdômen com manchas em azul escuro, pequeno abdômen dorsalmente pigmentado de azul escuro. Antenas rajadas de azul, pernas e fúrcula sem pigmentação (Fig. 1).

Antenas: Ant IV simples, sem subdivisões ou verticilos distintos, papila apical presente, com 93 cerdas e 23 sensilas (Fig. 2A). Ant III com 20 cerdas, órgão apical com duas sensilas em cavidades distintas e 2 vesículas, uma composta; Ant II com 15 cerdas, uma mais longa; Ant I com 7 cerdas, 2 mais curtas (Fig. 2B).

Cabeça: Mancha ocular com 8 ocelos e 2 cerdas interoculares. Região frontal com linha E com 4, linha D com 3, linha C com 2, linha B com 2 e linha A com 1 cerda, respectivamente; linha γ com 1, linha β com 2, linha α com 2, respectivamente. Fórmula das cerdas clipeais entre as linhas a e f como: 8/6/8/8/6/6 (Figs 2C, 2E). Região pré-labral com 6 cerdas; fórmula labral entre linhas p e a como 5/5/4, cerda a1 mais longa que as demais, a2 em papila (Fig. 2D). Região labial com 4 cerdas no campo basomedial e 4 no campo basolateral (Fig. 2E). Palpo maxilar com cerda apical mais longa que basal, placa sublobal com um apêndice em forma de cerda (Fig. 2F). Maxila com ápice globular, sem modificações evidentes, mandíbulas com 4+5 dentes (Fig. 2G).

Pernas: Perna I: Epicoxa, coxa e subcoxa com 1, 0, 1 cerdas, respectivamente; trocânter com 3 cerdas; fêmur com 12 cerdas; tibiotarso com 45 cerdas, verticilo distal com 11 cerdas, 5 como tenent-hairs; pré-tarso com duas cerdas, uma anterior e outra posterior, unguis com pseudoníquia e dois dentes internos, unguículus com um dente interno proeminente proximal e um reduzido subapical, filamento apical mais curto que o unguis (Figs 3A, 3D). Perna II: Epicoxa, coxa e subcoxa com 1, 1, 2 cerdas, respectivamente; trocânter com 4 cerdas e um órgão trocanteral em alvéolo triangular; fêmur com 13 cerdas; tibiotarso com 42 cerdas, verticilo distal com 11 cerdas, 5 como tenent-hairs; pré-tarso com duas cerdas, uma anterior e outra posterior, unguis com pseudoníquia e dois dentes internos, unguículus com um dente interno proeminente proximal, um reduzido subapical e ápice serrilhado, filamento apical mais curto que o unguis (Figs 3B, 3E). Perna III: Epicoxa, coxa e subcoxa com 1, 1, 3 cerdas, uma menor em alvéolo amplo, respectivamente; trocânter com 4 cerdas e um órgão trocanteral em alvéolo triangular; fêmur com 14 cerdas; tibiotarso com 41 cerdas, verticilo distal com 11 cerdas, 4 como tenent-hairs; pré-tarso com duas cerdas, uma anterior e outra posterior, unguis com pseudoníquia e dois dentes internos, unguículus com um dente interno proeminente proximal e ápice serrilhado, filamento apical mais curto que o unguis (Figs 3C, 3F).

Grande Abdome: com cerdas curtas e lisas. Tricobótrias A, B, C presentes, desalinhadas; Th II com linhas a/m com 1, 4 cerdas; Th. III com linhas a/m com 1, 6 cerdas; Abd. I com linhas a/m/p com 1, 1, 1 cerdas; Abd. II com linhas a/m/p com 5, 4, 6 cerdas, incluindo tricobótrias; Abd. III–IV com linhas dl-1/dll-1/dlll-1/dlV-1 com 5, 4,

4, 2 cerdas. Área parafurcal com 7-8 cerdas e 1 cerda neosminthuróide cilíndrica e simples (Fig. 4A).

Pequeno Abdome e Placa Genital: formado por Abd V-VI. Abd V com 8-9 cerdas, tricobótria D presente (Fig. 4A). Abd VI: valva anal dorsal feminina com as2–4, ms1–5, mps1–3, ps1–2, ms1 e ps1 ímpares, ms1 bifurcada. Valva anal ventral feminina com ai1–8; aai1–6, mp1–2, mi1–5, pi1–3, mi5 como apêndice subanal com ápice serrilhado (Fig. 4B). Valva anal dorsal masculina com as1–3, ams2, ms1–5, mps1–3, ps1–2, as1, ms1 e ps1 ímpares. Valva anal ventral masculina com ai1–3; mi1–5; pi1–3 (Fig. 4D). Placa genital feminina com 6+6 cerdas ventrais (Fig. 4C). Placa genital masculina com 8+8 cerdas ventrais (Fig. 4E).

Fúrcula: Manúbrio com 7–8 cerdas dorsais (Fig. 5A). Dens dorsal com 12 cerdas (Fig. 5A); face ventral do dens com 4 cerdas, seguindo a fórmula 1...3 (Fig 5B). Mucro com ambas as margens serrilhadas, interna com aproximadamente 10, externa com aproximadamente 12 dentes, cerda mucronal ausente (Fig. 5A).

Distribuição e habitat. A espécie é encontrada, até o momento, apenas em sua localidade-tipo, na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Os espécimes coletados habitavam o ambiente edáfico de um pequeno fragmento urbano de Mata Atlântica (Mata da CAERN) durante o período chuvoso, em abril de 2022. A amostragem realizada sugere que os indivíduos dessa espécie apresentam comportamentos típicos da fauna epiedáfica de Symphypleona, forrageando a superfície do solo e a serapilheira.

Notas taxonômicas. O *Sminthurinu*s sp. nov é a terceira espécie descrita do gênero registrada no Brasil, sendo o primeiro registro do gênero no Nordeste do país. A espécie se diferencia de seus congêneres brasileiros, *Sminthurinus molinai* Arlé, 1940 e *S. aureussetosus* Bretfeld, 2002, por: seu padrão de coloração, com fundo alaranjado e manchas azuladas no tronco (com manchas verdes e vermelho-alaranjadas em *S. molinai*, com fundo escuro e manchas brancas em *S. aureussetosus*); úngues com dois dentes internos (sem dentes em *S. molinai*); unguículus com ao menos dois dentes internos (com no máximo um em *S. molinai* e *S. aureussetosus*); tibiotarso III com quatro tenent hairs (cinco em *S. aureussetosus*), e apêndice subanal da fêmea com ápice serrilhado (simples em *S. molinai*).

As características de dois dentes internos nos unguis e mucro com margens serrilhadas faz com que a nova espécie se aproxime mais de *S. quadrimaculatus* Ryder, 1878 e *S. sayi* Denis, 1933. Por possuir 5, 5, 4 tenent hairs no tibiotarso, se difere dessas duas espécies, as quais possuem: 4, 4, 4 tenent hairs em *S. quadrimaculatus* e 5 tenent hairs no tibiotarso III de *S. sayi*.

Conclusão

Muitas espécies dentro da família Katiannidae foram descritas baseadas predominantemente em suas colorações, o que acaba escondendo a real diversidade críptica existente. Portanto, a descrição completa e detalhada do *Sminthurinus* sp. nov.

busca reforçar a importância do mapeamento da quetotaxia em espécies de Symplypleona, fornecendo uma base sólida para a delimitação de táxons no grupo.

Referências

ARLÉ, R. Uma nova espécie de Sminthurinus (Collembola) do Rio de Janeiro. Revista Chilena de História Natural, Santiago, v. 44, p. 264-266, 1940.

ARLÉ, R.; MENDONÇA, M. C. Estudo preliminar das espécies de Dicranocentrus Schött (1893) ocorrentes no Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro (Collembola). Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro, v. 42, p. 41-49, 1982.

BARETTA, D. et al. Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com Araucaria angustifolia. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 32, p. 2693-2699, 2008.

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. Checklist of the Collembola of the World. 1996-2024. Disponível em: http://www.collembola.org. Acesso em: 02/06/2026.

BELLINI, B. C.; WEINER, W. M.; WINCK, B. R. Systematics, Ecology and Taxonomy of Collembola: Introduction to the Special Issue. Diversity, Basel, v. 15, n. 2, p. 221, 2023.

BÖRNER, C. Zur Kenntnis de Apterygoten-Fauna von Bremen und der Nachbardistrikte, Beitrag zu einer Apterygoten-Fauna Mitteleuropas. Abhandlungen Herausgegeben vom Naturwissenschaftlichen Verein zu Bremen, Bremen, v. 17, p. 1-140, 1901.

BRETFELD, G. Synopses on Palaearctic Collembola Volume 2: Symphypleona. Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz, Görlitz, v. 71, n. 1, p. 1-318, 1999.

BRETFELD, G. Known and new genera and species of Symphypleona (Insecta, Collembola) obtained by canopy fogging in Central Amazonia, Brazil. Amazoniana, Kiel, v. 17, n. 1/2, p. 109-137, 2002.

CASSAGNE, N. et al. Relationships between Collembola, soil chemistry and humus types in forest stands. Biology and Fertility of Soils, v. 37, p. 355-361, 2003.

CICCONARDI, F.; FANCIULLI, P. P.; EMERSON, B. C. Collembola, the biological species concept, and the underestimation of global species richness. Molecular Ecology, v. 22, n. 21, p. 5382-5396, 2013.

DEHARVENG, L. Recent advances in Collembola systematics. Pedobiologia, Jena, v. 48, n. 5-6, p. 415-433, 2004.

DENIS, J. R. Contributo alla conoscenza del "microgenton" di Costa Rica, III. Collemboles de Costa Rica avec une contribution aux espèces de l'ordre (deuxième note). Bollettino del Laboratorio di Zoologia Generale e Agraria della R. Scuola Superiore d'Agricoltura in Portici, Portici, v. 27, p. 222-322, 1933.

HOPKIN, S. P. Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford: Oxford University Press, 1997.

PALACIOS-VARGAS, J. G.; VACAFLORES-ARGANDOÑA, C. Sminthurinus (Collembola: Symphypleona: Katiannidae) from Brazil, with Notes on the Systematics of the Family. Diversity, Basel, v. 14, n. 11, p. 960, 2020.

PETERSEN, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos, Copenhagen, v. 39, n. 3, p. 288-388, 1982.

POTAPOV, A. et al. Towards a global synthesis of Collembola knowledge - Challenges and potential solutions. Soil Organisms, Görlitz, v. 92, n. 3, p. 161-188, 2020.

RYDER, J. A. Descriptions of a new species of Smynthurus. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia, v. 30, p. 335, 1878.

ZEPPELINI, D.; BELLINI, B. C. Introdução ao estudo dos Collembola. João Pessoa: Editora Universitária UFPB, 2004.

ZEPPELINI, D.; QUEIROZ, G. C.; BELLINI, B. C. Collembola. In: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD, 2023. Disponível em: http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/379. Acesso em: 27/06/2026.

ZEPPELINI, D. et al. Collembola. In: Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. 2026. Disponível em: http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/243158. Acesso em: 19 ago. 2026.

Anexos



Figura 1 - Habitus dorsal de Sminthurinus sp. nov., espécime fixado em etanol a 70%.



Figura 2 - Sminthurinus sp. nov. Cabeça: A, Ant IV, cerdas pretas representa sensilas; B, Ant I-II-III; C, Cabeça anterior e olhos. D, área pré-labral e labral (vista dorsal); E, Região pós labial (visão ventral); F, Lobo maxilar externo; G, Mandíbula es



Figura 3 - Sminthurinus sp. nov. Pernas: A, Perna I; B, Perna II; C, Perna III; D, Complexo empodial I; E, Complexo empodial II; F, Complexo empodial III.



Figura 4 - Sminthurinus sp. nov. A, Grande abdome; B, Pequeno abdome (fêmea), asteriscos indicam ímpares; C, Valva anal (fêmea); D, Pequeno abdome (macho), asteriscos indicam cerdas ímpares; E, Valva anal (macho).



Figura 5 - Sminthurinus sp. nov. A, Fúrcula (manúbrio, dens e mucro); B, região ventral do dens.

CÓDIGO: SB0357

AUTOR: MARIA CLARA RODRIGUES DO NASCIMENTO

COAUTOR: RAIANE VITAL DA PAZ

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Avaliação da eficácia do BirdNET no monitoramento acústico de avifauna em paisagens urbanas

Resumo

A bioacústica é uma importante ferramenta para o monitoramento da biodiversidade. Porém, a urbanização modifica a paisagem sonora, podendo dificultar a detecção das vocalizações das aves. Nesse contexto, algoritmos de aprendizado de máquina associados ao monitoramento acústico passivo (PAM) permitem automatizar a identificação de espécies. Este estudo avaliou a eficácia do BirdNET no monitoramento acústico de avifauna em paisagens urbanas. Foram realizadas gravações em oito praças públicas de Natal/RN, em janeiro de 2024, utilizando gravadores autônomos Song Meter SM3 e SM4 e AudioMoth. Vocalizações das espécies-alvo foram utilizadas para treinamento de um modelo personalizado, posteriormente aplicado às gravações de campo. Das 19 espécies utilizadas no treinamento, sete foram detectadas: *Coereba flaveola, Guira guira, Machetornis rixosa, Myiozetetes similis, Pitangus sulphuratus, Thraupis palmarum* e *Thraupis sayaca*. Com threshold de 0.50, o modelo apresentou Accuracy de 94.5%, Precision de 79.0%, Recall de 22.6% e F1-score de 28.5%. Com threshold de 0.95, Precision, Recall e F1-score foram reduzidos para 33.3%, 11.7% e 15.8%, respectivamente. Os resultados demonstram que o desempenho variou entre as espécies e que o aumento do threshold reduziu a capacidade de detectar vocalizações verdadeiras, evidenciando limitações do BirdNET para o monitoramento acústico em ambientes urbanos.

Palavras-chave: BirdNET. Bioacústica. Avifauna. Monitoramento acústico Passivo.

TITLE: Evaluation of BirdNET's effectiveness in acoustic monitoring of avifauna in urban landscapes

Abstract

Bioacoustics is an important tool for monitoring biodiversity. However, urbanization alters the soundscape, which can make it difficult to detect bird calls. In this context,

machine learning algorithms combined with passive acoustic monitoring (PAM) make it possible to automate species identification. This study evaluated the effectiveness of BirdNET in the acoustic monitoring of avifauna in urban landscapes. Recordings were made in eight public squares in Natal, Rio Grande do Norte, in January 2024, using Song Meter SM3 and SM4 standalone recorders and AudioMoth. Vocalizations from the target species were used to train a customized model, which was subsequently applied to the field recordings. Of the 19 species used in training, seven were detected: *Coereba flaveola, Guira guira, Machetornis rixosa, Myiozetetes similis, Pitangus sulphuratus, Thraupis palmarum*, and *Thraupis sayaca*. With a threshold of 0.50, the model achieved an accuracy of 94.5%, precision of 79.0%, recall of 22.6%, and an F1-score of 28.5%. With a threshold of 0.95, Precision, Recall, and F1-score were reduced to 33.3%, 11.7%, and 15.8%, respectively. The results demonstrate that performance varied among species and that increasing the threshold reduced the ability to detect true vocalizations, highlighting limitations of BirdNET for acoustic monitoring in urban environments.

Keywords: BirdNET. Bioacoustics. Birdlife. Passive acoustic monitoring.

Introdução

O processo de urbanização, cada vez mais acelerado nas últimas décadas, tem provocado profundas transformações nos ecossistemas naturais e afetado diretamente a biodiversidade (Francis et al., 2009). A expansão das cidades leva à fragmentação de habitats, à perda de cobertura vegetal e ao aumento de fatores de estresse, entre eles o ruído antrópico, considerado um dos elementos mais perturbadores da vida silvestre (Sweet et al., 2022; Latifi et al., 2023). Os ruídos antropogênicos, resultantes de atividades humanas como o tráfego de veículos, construção civil e indústrias, diferem dos ruídos naturais por apresentarem maior intensidade, continuidade e amplitude de frequências (Sweet et al., 2022). Esses sons artificiais interferem na comunicação acústica das aves, componente essencial para a defesa territorial, a manutenção de pares e o sucesso reprodutivo (Slabbekoorn et al., 2006; Halfwerk et al., 2011). Quando os sinais sonoros são mascarados pelo ruído urbano, os emissores não conseguem transmitir suas mensagens de forma eficiente, o que pode afetar diretamente a capacidade de compreensão do outro animal (Luther et al., 2012).

Com base nisso, a teoria da ecologia da paisagem sonora estabelece que o ambiente acústico é composto por três principais fontes sonoras: geofonia, referente aos sons naturais não biológicos, como o vento ou a chuva; biofonia, que é produzida pelos organismos vivos; e antrofonia, que é associada às atividades humanas (Pijanowski et al., 2011). E ao longo de gradientes urbanos-rurais, observa-se uma substituição progressiva da biofonia por sons de origem antrópica resultantes de atividades humanas; e, nisso, o ruído antrópico se torna um componente dominante nas paisagens sonoras urbanas, alterando a estrutura acústica e não representando apenas uma perturbação sensorial, mas também um fator de pressão adaptativa sobre as espécies aviadoras (Joo et al., 2011).

Essas evidências sugerem que os ruídos antrópicos atuam como forças seletivas que moldam as comunidades de aves e podem gerar mudanças evolutivas na estrutura dos cantos (Francis et al., 2011). De forma semelhante, o ruído antropogênico, por ser um poluente global, induz ajustes acústicos em diversas espécies, reforçando seu papel como agente seletivo na evolução dos sinais de comunicação de aves em diferentes regiões e

habitats. Assim, o ruído urbano exerce uma exposição contínua a sons artificiais, levando a ajustes significativos nos sinais vocais, como a frequência e a amplitude de cantos, a modificação do ritmo e, em alguns casos, a redução da complexidade das vocalizações. (Kunc e Schmidt et al., 2020).

O monitoramento acústico passivo (PAM) tem se consolidado como uma ferramenta não invasiva para o monitoramento da biodiversidade, permitindo a obtenção de dados acústicos em diferentes escalas espaciais e temporais, bem como em diversos tipos de ecossistemas (Darras et al., 2025). O avanço dos gravadores autônomos e o aumento da quantidade de dados gerados por esse tipo de monitoramento impulsionaram o desenvolvimento de métodos automatizados para a análise das gravações, com destaque para algoritmos de aprendizado de máquina aplicados à identificação de vocalizações de aves. Nesse contexto, o BirdNET constitui uma das ferramentas utilizadas para o reconhecimento automatizado de sons de aves, realizando a análise das gravações em segmentos e atribuindo níveis de confiança às identificações realizadas (Pérez-Granados et al., 2025). Apesar de seu potencial para ampliar a análise de grandes volumes de dados acústicos, o desempenho do BirdNET pode variar entre espécies, regiões e condições ambientais, além de ser influenciado pela configuração de parâmetros, como o threshold de confiança, evidenciando a importância de avaliar sua eficiência em diferentes contextos de monitoramento (Funosas et al., 2026; Pérez-Granados et al., 2025).

Metodologia

O estudo foi realizado em oito praças públicas localizadas no município de Natal, Rio Grande do Norte, selecionadas de modo a representar diferentes tipologias urbanas, incluindo áreas centrais, residenciais e periurbanas. A região apresenta clima tropical chuvoso, com estações secas e úmidas bem definidas. A área de estudo está localizada na parte norte da Mata Atlântica, um dos biomas mais ameaçados do Brasil em decorrência da intensa fragmentação causada pelas atividades humanas.

A coleta de dados foi realizada durante o mês de janeiro de 2024 (estação seca), sucessivamente em três dias em cada local, foram utilizados gravadores autônomos Song Meter (modelos SM3 e SM4) e AudioMoth, colocados a 1.5 m de altura nos troncos de árvores. Para que as gravações fossem feitas de forma padronizada, a taxa de amostragem de todos os equipamentos foi de 48 kHz e o ganho entre 12-16 dB. Além disso, foram programados para gravar no período de maior atividade vocal das aves (4h50 às 9h30) com gravações de 15 minutos e pausas de 0.5 segundos.

A análise dos dados teve início com a inspeção dos espectrogramas das gravações do banco de dados, utilizando o software Raven Pro 1.6 (Cornell Lab of Ornithology), visando identificar as vocalizações das espécies de interesse. Após a identificação, foram feitas delimitações manuais das vocalizações selecionadas por meio da criação de caixas de seleção nos espectrogramas. Em seguida, foram obtidos arquivos de áudio de vocalizações das espécies-alvo nas plataformas de ciência cidadã WikiAves e Xeno-Canto, priorizando-se gravações com alta qualidade e quantidade de vocalizações.

Os arquivos selecionados foram organizados por espécie e submetidos a um pré-processamento no software Audacity. Nessa etapa, os áudios foram segmentados em clipes de aproximadamente três segundos de duração, permitindo o isolamento das vocalizações de interesse e reduzindo a influência dos ruídos antrópicos, ambientais ou de outras espécies. Essa padronização permitiu a preparação dos arquivos para o treinamento do modelo de reconhecimento acústico. Após essa etapa, os arquivos foram organizados em pastas e subpastas correspondentes a cada espécie-alvo, seguindo a estrutura necessária para a criação de modelos personalizados no BirdNET. Também foi incluída uma categoria denominada "Other", composta por sons que não pertenciam às espécies-alvo, incluindo diferentes tipos de ruídos ambientais e antrópicos.

Com o banco de treinamento devidamente estruturado, os arquivos foram submetidos ao treinamento no BirdNET. Durante esse processo, o algoritmo utilizou as vocalizações previamente selecionadas para identificar e aprender características acústicas associadas a cada espécie, resultando na geração de um modelo de classificação personalizado (Class).

Após a conclusão do treinamento, foi realizada uma análise em lote (Batch Analysis), na qual o modelo personalizado foi aplicado às gravações obtidas em campo. Nessa etapa, o BirdNET processou automaticamente os arquivos de áudio e comparou os sinais acústicos detectados aos padrões aprendidos durante o treinamento, gerando as classificações correspondentes às espécies-alvo. Dessa forma, o procedimento permitiu automatizar a triagem das gravações e a identificação das vocalizações de interesse no conjunto de dados analisado.

Resultados e Discussões

O desempenho dos modelos treinados foi avaliado a partir de diferentes métricas de classificação: Accuracy (acurácia), Precision (precisão), Recall (sensibilidade), F1-score e Average Precision (AP). Essas métricas permitem avaliar diferentes aspectos do desempenho do classificador, considerando tanto a capacidade de realizar classificações corretas quanto a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos (Kahl et al., 2021).

A métrica "Accuracy" corresponde à proporção de classificações corretas realizadas pelo modelo em relação ao total de classificações, incluindo tanto os casos em que a espécie está presente e é corretamente identificada quanto os em que está ausente e não é detectada. Apesar de fornecer uma visão geral do desempenho, essa métrica pode ser pouco representativa quando há um forte desequilíbrio entre as classes. Nesses casos, uma elevada acurácia pode ocorrer mesmo quando o modelo apresenta baixa capacidade de reconhecer corretamente as vocalizações de determinadas espécies.

A métrica "Precision" avalia a confiabilidade das detecções realizadas pelo modelo. Essa métrica representa a proporção das vocalizações classificadas pelo algoritmo como pertencentes a uma determinada espécie que, de fato, correspondem àquela espécie. Assim, valores elevados de Precision estão associados a uma menor quantidade de falsos positivos. O Recall, por sua vez, está relacionado à capacidade do modelo de recuperar as vocalizações que de fato estão presentes nas gravações. Essa métrica considera

principalmente os falsos negativos, de modo que valores elevados indicam maior capacidade de detectar ocorrências verdadeiras. Dessa maneira, Precision e Recall representam aspectos complementares do desempenho: enquanto a primeira indica a confiabilidade das detecções, a segunda indica a capacidade de não deixar de detectar vocalizações presentes.

A métrica "F1-score" combina Precision e Recall em uma única medida, calculada como a média harmônica dessas duas métricas. Por considerar simultaneamente a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos, o F1-score é útil para avaliar o equilíbrio entre a confiabilidade das detecções e a capacidade de identificar as vocalizações presentes. Valores elevados indicam que o modelo apresenta desempenho consistente em ambos os aspectos.

A métrica "Average Precision (AP)" fornece uma avaliação integrada da relação entre Precision e Recall considerando diferentes limiares de confiança utilizados pelo classificador. Dessa forma, em vez de avaliar o desempenho em apenas um ponto de corte, essa métrica sintetiza o comportamento do modelo em diferentes níveis de decisão, permitindo uma avaliação mais abrangente de sua capacidade de discriminar entre as classes. Para todas as métricas consideradas, valores mais próximos de 1 indicam melhor desempenho, embora a interpretação de cada medida deva levar em conta o aspecto específico da classificação que representa.

O modelo indicou que, das 19 espécies utilizadas no treinamento, apenas sete foram detectadas pelo BirdNET nas gravações analisadas. Considerando todas as espécies, o modelo apresentou Accuracy de 94.5%, Precision de 79%, Recall de 22.6% e F1-score de 28.5%, utilizando threshold de 0.50%. A alta Accuracy indica que o modelo corretamente identificou a maioria dos eventos em que a espécie não estava presente. Contudo, o baixo Recall demonstra que uma parte considerável das vocalizações presentes não foi detectada. A Precision de 79.0% mostra que a maior parte corresponde corretamente às espécies previstas pelo modelo. O F1-score foi relativamente baixo, de 28.5%, indicando desempenho limitado do modelo, uma vez que essa métrica combina a Precision e o Recall em um único indicador, indicando simultaneamente a confiabilidade das identificações e a capacidade de detectar as vocalizações presentes (Figura 1).

A avaliação também foi realizada individualmente para as sete espécies detectadas. Para compreender melhor esses resultados, foram utilizadas matrizes de confusão, que permitem observar os acertos e erros do modelo a partir de quatro situações: verdadeiro positivo (TP), quando a vocalização estava presente e foi detectada corretamente; verdadeiro negativo (TN), quando estava ausente e o modelo indicou sua ausência; falso positivo (FP), quando o modelo indicou a presença de uma vocalização que não estava presente; e falso negativo (FN), quando a vocalização estava presente, mas não foi detectada (Figura 2).

No threshold de 0.50, as matrizes mostraram diferenças na capacidade de detecção entre as espécies. *Guira guira* apresentou a maior proporção de verdadeiros positivos, com 80%, seguida de *Myiozetetes similis*, com 49%. Para *Pitangus sulphuratus* e Thraupis palmarum, os valores de verdadeiros positivos foram de 28% e 16%, respectivamente. As menores proporções foram observadas para *Machetornis rixosa*, com 4%, *Thraupis sayaca*, com 2%, e *Coereba flaveola*, com 1%. Consequentemente,

essas últimas espécies apresentaram elevadas taxas de falsos negativos, chegando a 99% para *Coereba flaveola*, 98% para *Thraupis sayaca* e 96% para *Machetornis rixosa.*

Com o aumento do threshold para 0.95, as métricas de desempenho foram reduzidas, com Precision de 33.3%, Recall de 11.7% e F1-score de 15.8%, enquanto a Accuracy permaneceu em 93.9% (Figura 3). Esses resultados indicam uma redução na capacidade do BirdNET de recuperar vocalizações verdadeiras, o que aumenta a ocorrência de falsos negativos.

Nesse threshold, *Guira guira* permaneceu com a maior proporção de verdadeiros positivos, embora tenha apresentado uma redução de 80% para 60%. Em *Myiozetetes similis*, os verdadeiros positivos diminuíram de 49% para 27%, enquanto em *Pitangus sulphuratus* passaram de 28% para 7%. Para *Coereba flaveola, Machetornis rixosa, Thraupis palmarum* e *Thraupis sayaca*, não foram registrados verdadeiros positivos nesse nível de confiança (Figura 4).

Os resultados deste estudo demonstraram que o desempenho do BirdNET variou entre as espécies, com melhor capacidade de detecção para algumas e maior ocorrência de falsos negativos para outras. Também foi notado que a qualidade da vocalização no espectrograma foi insignificante, pois o software detectou alguns de má qualidade e ignorou uns de excelente visualização. Esse comportamento foi observado por Funosas et al. (2026), que encontraram diferenças no desempenho do BirdNET entre espécies, regiões e biomas, indicando que a eficiência do modelo não é uniforme.

A redução do Recall e do F1-score com o aumento do threshold de 0.50 para 0.95 tem uma base, como foi visto no trabalho de Pérez-Granados et al. (2026), que mostra que a escolha do threshold influencia diretamente o desempenho do BirdNET. Valores mais elevados tornam o critério de identificação mais restritivo e podem aumentar a quantidade de vocalizações verdadeiras que não são detectadas. Além disso, por se tratar de gravações realizadas em ambiente urbano, fatores presentes na paisagem sonora podem interferir na detecção das vocalizações. Darras et al. (2025) ressaltam o impacto dos sons antropogênicos sobre o ambiente sonoro, aspecto relevante para estudos que utilizam monitoramento acústico passivo (PAM).

Conclusão

Os resultados evidenciam que, nas condições avaliadas, o BirdNET apresentou limitações no monitoramento acústico de aves em ambiente urbano. Embora o modelo tenha demonstrado confiabilidade nas identificações realizadas, sua capacidade de detectar as vocalizações presentes foi reduzida, indicando que a elevada Accuracy, isoladamente, não representa o desempenho do classificador nesse contexto. Dessa forma, o uso de métricas complementares, como Precision, Recall e F1-score, mostrou-se fundamental para uma avaliação mais abrangente do desempenho do modelo.

As diferenças observadas entre as espécies demonstram ainda que a capacidade de detecção do BirdNET não ocorreu de maneira uniforme, apresentando melhor

desempenho para algumas espécies e maior dificuldade de reconhecimento para outras. Além disso, a redução do desempenho com o aumento do threshold evidencia a importância da escolha adequada desse parâmetro, especialmente em estudos voltados à detecção da presença das espécies.

Diante disso, o BirdNET apresenta potencial como ferramenta de apoio ao monitoramento acústico passivo da avifauna, porém sua aplicação em ambientes urbanos requer ajustes que considerem as características das espécies e as condições das gravações. A ampliação e diversificação do banco de dados utilizado no treinamento, principalmente para as espécies com menor capacidade de detecção, bem como a calibração dos parâmetros do modelo, podem contribuir para melhorar seu desempenho. Assim, o aprimoramento dessas etapas poderá ampliar a eficiência e a aplicabilidade do BirdNET no monitoramento da avifauna em ambientes urbanos.

Referências

DARRAS, Kevin F. A. et al. Worldwide soundscapes: a synthesis of passive acoustic monitoring across realms.Global Ecology and Biogeography, v. 34, n. 5, e70021, 2025. Disponível em:https://doi.org/10.1111/geb.70021.

FRANCIS, Clinton D.; ORTEGA, Catherine. P.; CRUZ, Alexander. Noise pollution changes avian communities and species interactions.Current Biology, v. 19, n. 16, p. 1415-1419, 2009. Disponível em:https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.052.

FRANCIS, C. D.; ORTEGA, C. P.; CRUZ, A. Noise Pollution Filters Bird Communities Based on Vocal Frequency. PLOS ONE, v. 6, n. 11, e27052, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027052.

FUNOSAS, David et al. A global assessment of BirdNET performance: differences among continents, biomes, and species. Ecological Indicators, v. 182, 114550, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.114550.

HALFWERK, Wouter.; HOLLEMAN, Leonard. J. M.; LESSELLS, C. (Kate) M. Negative impact of traffic noise on avian reproductive success.Journal of Applied Ecology, v. 48, n. 1, p. 210-219, 2011. Disponível em:https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01914.x.

JOO, W.; GAGE, S.H.; KASTEN, E. P. Analysis and interpretation of variability in soundscapes along an urban–rural gradient. Landscape and Urban Planning, v. 103, p. 259-276, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.08.001.

KUNC, H. P.; SCHMIDT, R. Species sensitivities to a global pollutant: A meta-analysis on acoustic signals in response to anthropogenic noise, v. 27, n. 3, p. 675–688, 2020. Disponível em:https://doi.org/10.1111/gcb.15428.

LATIFI, Milad.; FAKHERAN, Sima.; MOSHTAGHIE, Minoo. Soundscape analysis using eco-acoustic indices for the birds biodiversity assessment in urban parks (case study: Isfahan City, Iran).Environmental Monitoring and Assessment, v. 195, n. 6, p. 629, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10661-023-11237-2.

LUTHER, David. A.; DERRYBERRY, Elizabeth. P. Birdsongs keep pace with city life: changes in song over time in an urban songbird affects communication.Animal Behaviour, v. 83, n. 4, p. 1059-1066, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.034.

PÉREZ-GRANADOS, Cristian et al. Optimization of passive acoustic bird surveys: a global assessment of BirdNET settings. Ibis, v. 168, n. 2, p. 785–798, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.1111/ibi.70013.

PIJANOWSKI, B. C.; FARINA, A.; GAGE, S. H. What is soundscape ecology? An introduction and overview of an emerging new science. Landscape Ecology, v. 26, p 1213-1232, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10980-011-9600-8.

SLABBEKOORN, Hans.; DEN BOER-VISSER, Ardie. Cities change the songs of birds.Current Biology, v. 16, n. 23, p. 2326-2331, 2006. Disponível em:https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.008.

SWEET, K. A.; SWEET, B. P.; GOMES, D. G. E.; FRANCIS, C. D.; BARBER, J.R. Natural and anthropogenic noise increase vigilance and decrease foraging behaviours in song sparrows.Behavioral Ecology, v. 33, n. 1, p. 288-297, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1093/beheco/arab141.

Anexos



Figura 1- Métricas de desempenho geral no modelo BirdNET com threshold 0.50.



Figura 2 - Matrizes de confusão do modelo BirdNET para as espécies detectadas, no threshold 0.50.



Figura 3 - Métricas de desempenho geral no modelo BirdNET com threshold 0.95.



Figura 4 - Matrizes de confusão do modelo BirdNET para as espécies detectadas, no threshold 0.95.

CÓDIGO: SB0363

AUTOR: RAFAEL LINO MOKWA

COAUTOR: GABRIELLE MARQUES DE PAIVA

ORIENTADOR: AURIGENA ANTUNES DE ARAUJO

TÍTULO: Avaliação do efeito protetor do Lactobacillus plantarum na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos Swiss

Resumo

A mucosite intestinal é uma das principais complicações da quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU), acometendo cerca de 80% dos pacientes e comprometendo a continuidade do tratamento oncológico. Os probióticos, especialmente as bactérias produtoras de ácido lático, têm se destacado como estratégia adjuvante por seus efeitos anti-inflamatórios e restauradores da barreira intestinal. Este estudo avaliou o efeito protetor do Lactobacillus plantarum na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos Swiss. Foram utilizados 21 animais machos, distribuídos em três grupos (n=7): Salina, 5-FU e L. plantarum + 5-FU, este último tratado por via oral durante 18 dias, com indução da mucosite por 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no 15º dia. Avaliaram-se variação de peso, hematologia, histopatologia intestinal, citocinas (IL-1 beta e IL-10), expressão gênica de NF-kappa beta e ZO-1, e metagenômica fecal. O grupo L. plantarum + 5-FU apresentou redução da perda de peso de 12,6% para 10,9%, redução do dano histológico em duodeno e íleo, atenuação de IL-1 beta e NF- kappa beta, aumento de IL-10 e ZO-1, além de maior abundância de Lactobacillaceae e contenção de Clostridiaceae. Conclui-se que o L. plantarum exerceu efeito protetor sobre a mucosite intestinal, atuando na preservação tecidual, modulação imunológica e manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Mucosite intestinal; 5-fluorouracil; Probióticos; L. plantarum

TITLE: Evaluation of the protective effect of Lactobacillus plantarum on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in Swiss mice.

Abstract

Intestinal mucositis is a major complication of 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy, affecting approximately 80% of patients and compromising the continuity of cancer treatment. Probiotics, particularly lactic acid-producing bacteria, have emerged as an adjuvant strategy due to their anti-inflammatory effects and ability to restore the intestinal barrier. This study evaluated the protective effect of Lactobacillus plantarum against 5-FU-induced intestinal mucositis in Swiss mice. Twenty-one male animals were used, distributed into three groups (n=7): Saline, 5-FU, and L. plantarum + 5-FU; the latter group received oral treatment for 18 days, with mucositis induction by 5-FU (450 mg/kg, i.p.) on day 15. Assessments included weight variation, hematology, intestinal histopathology, cytokines (IL-1B and IL-10), gene expression of NF-kB and ZO-1, and fecal metagenomics. The L. plantarum + 5-FU group showed a reduction in weight loss (from 12.6% to 10.9%), reduced histological damage in the duodenum and ileum, attenuated IL-1B and NF-kB levels, increased IL-10 and ZO-1 levels, higher abundance of Lactobacillaceae, and containment of Clostridiaceae. It is concluded that L. plantarum exerted a protective effect against intestinal mucositis, acting through tissue preservation, immune modulation, and the maintenance of intestinal microbiota balance

Keywords: Intestinal mucositis; 5-fluorouracil; Probiotics; L. plantarum

Introdução

O câncer representa a segunda principal causa de morte no mundo, tendo sido responsável por cerca de 10 milhões de óbitos em 2020 (FERLAY et al., 2021). Entre as estratégias terapêuticas disponíveis, a quimioterapia permanece como um dos principais pilares do tratamento oncológico (GUICHARD et al., 2017). O 5-fluorouracil (5-FU), sintetizado por Heidelberger et al. (1957), é um dos quimioterápicos mais utilizados na prática clínica, sendo um antimetabólito que atua pela inibição da timidilato sintase e pela incorporação de metabólitos no RNA e DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Apesar de sua eficácia antitumoral, os agentes quimioterápicos não atuam de forma específica, comprometendo também células normais de rápida proliferação, como as do trato gastrointestinal (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). Como consequência, aproximadamente 80% dos pacientes tratados com 5-FU desenvolvem mucosite intestinal, caracterizada por dor, inflamação, ulceração, diarreia e sangramento, o que frequentemente leva à redução de dose ou interrupção do tratamento, diminuindo as chances de cura (KIM et al., 2018; GIBSON; KEEFE, 2006).

A fisiopatologia da mucosite é multifatorial, envolvendo aumento da expressão de receptores Toll-like 4 (TLR-4), produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1B, IL-6, TNF-alfa), ativação do fator nuclear- kappa B (NF- kappa B) e formação de espécies reativas de oxigênio (LOGAN et al., 2007; CHANG et al., 2012; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Esse dano compromete as proteínas de junção estreita (ocludina, ZO-1, mucina-2), essenciais à manutenção da barreira intestinal (BISCHOFF et al., 2014), e provoca disbiose da microbiota intestinal, favorecendo a expansão de patógenos oportunistas em detrimento de bactérias benéficas (STRINGER et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2017).

Nesse contexto, os probióticos, sobretudo as bactérias produtoras de ácido lático, vêm sendo estudados como estratégia adjuvante no manejo da mucosite intestinal, por sua capacidade de reduzir a apoptose epitelial, competir com patógenos pela adesão à mucosa, modular a resposta imunológica e preservar a integridade da barreira intestinal (CARVALHO et al., 2017; GEIER et al., 2007). Dentre essas cepas, o Lactobacillus plantarum destaca-se por sua segurança, capacidade de produzir substâncias antimicrobianas e efeitos benéficos já descritos em outros modelos de colite (CEBECI; GÜRAKAN, 2003; CHU et al., 2010).

Diante da escassez de estudos que avaliem especificamente o efeito do L. plantarum sobre a mucosite induzida por 5-FU, integrando parâmetros clínicos, hematológicos, histopatológicos, inflamatórios, moleculares e da microbiota intestinal, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito protetor do Lactobacillus plantarum na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos Swiss, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas complementares que preservem a qualidade de vida e a adesão de pacientes ao tratamento antineoplásico.

Metodologia

Trata-se de um ensaio pré-clínico utilizando modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU) em camundongos da linhagem Swiss. O experimento foi realizado na Base de Pesquisas em Farmacologia do Departamento de Biofísica e Farmacologia/Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRN nº 010-2025), em conformidade com as diretrizes do CONCEA.

Foram utilizados 21 camundongos machos Swiss (Mus musculus), pesando 25-30 g, com 06-08 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biociências da UFRN, alojados em caixas de polipropileno com ração e água ad libitum, ciclo claro/escuro de 12h, temperatura de 22±2ºC e umidade relativa de 50±5%. O tamanho amostral foi calculado pela fórmula de graus de liberdade para estudos com animais (ARIFIN; ZAHIRUDDIN, 2017).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=7/grupo): - Salina (Controle Negativo): solução salina por via oral durante 18 dias e salina intraperitoneal (i.p.) no 15º dia; - 5-FU (Controle Positivo): salina por via oral durante 18 dias e dose única de 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no 15º dia, conforme Oliveira et al. (2021); - L. plantarum + 5-FU (Grupo Teste): L. plantarum (1×10⁹ UFC/mL, via oral) diariamente durante 18 dias, associado à indução da mucosite com 5-FU no 15º dia, mantendo-se o probiótico até o final do protocolo.

O L. plantarum foi fornecido pelo Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFRN e diluído em água estéril. Os animais foram monitorados diariamente quanto a sinais clínicos de estresse e sofrimento. No 19º dia, todos foram submetidos à eutanásia (cetamina 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg), conforme a Resolução Normativa nº 37/2018 do CONCEA, para coleta de sangue, segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e fezes.

O peso corporal foi aferido no 15º e no 19º dia para cálculo da variação percentual [(peso 19º dia/peso 15º dia) x 100]. Amostras de sangue total (punção cardíaca, EDTA) foram utilizadas para contagem global de leucócitos e plaquetas.

Para a análise histopatológica, fragmentos intestinais foram fixados em formalina tamponada a 10%, incluídos em parafina, corados com hematoxilina-eosina e classificados quanto à gravidade da mucosite segundo escores adaptados de MacPherson e Pfeiffer (1978), de forma simples-cega. A análise imuno-histoquímica para MUC-2 e ocludina foi realizada em cortes de 3 µm, com recuperação antigênica (Trilogy™, 95ºC/60min), bloqueio de peroxidase endógena e revelação com DAB, quantificada como percentual de área imunopositiva.

Os níveis de IL-1B e IL-10 em tecido intestinal foram determinados por ELISA (R&D Systems), com leitura de absorbância a 490 nm (ARAÚJO et al., 2013). A expressão gênica de NF- kappa B p65 e ZO-1 foi avaliada por RT-qPCR (StepOne Plus, Applied Biosystems), a partir de RNA extraído de segmentos de jejuno (Trizol™), com cDNA sintetizado por transcrição reversa e quantificação relativa pelo método 2^-delta-delta-CT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A análise metagenômica fecal foi realizada a partir de amostras coletadas no 19º dia, com extração de DNA (QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit, Qiagen) e quantificação por NanoDrop One e Qubit 3.0, para avaliação da abundância relativa das famílias bacterianas.

Os dados foram expressos como média e desvio padrão, sendo aplicados testes paramétricos (ANOVA, pós-teste de Bonferroni) e não paramétricos (Kruskal-Wallis) no software GraphPad Prism 6.01, adotando-se $p<0,05$ como nível de significância.

Resultados e Discussões

VARIAÇÃO DE PESO CORPORAL

O peso corporal foi avaliado no 15º dia (basal, antes da administração intraperitoneal) e no 19º dia (antes da eutanásia), calculando-se a variação percentual entre esses dois momentos. O grupo Salina apresentou ganho ponderal de 1,3%, enquanto os grupos submetidos à indução da mucosite apresentaram perda de peso: o grupo 5-FU foi o mais afetado, com perda de 12,6%, seguido do grupo L. plantarum + 5-FU, com perda de 10,9%.

A perda de peso é um dos principais sinais clínicos da mucosite intestinal induzida por 5-FU, decorrente da lesão da mucosa, má absorção de nutrientes, diarreia e redução da ingestão alimentar (KIM et al., 2018; GIBSON; KEEFE, 2006). A menor perda de peso observada no grupo tratado com L. plantarum, embora não tenha impedido totalmente o efeito do 5-FU, sugere um efeito atenuante do probiótico sobre os prejuízos nutricionais e funcionais da mucosite, corroborando estudos que demonstram efeito protetor

semelhante com outras cepas de Lactobacillus, como o Lacticaseibacillus casei (BARBOSA et al., 2022).

HEMATOLOGIA: LEUCÓCITOS E PLAQUETAS

A administração de 5-FU induziu mielossupressão, refletida na redução das contagens de leucócitos e plaquetas em relação ao grupo Salina, achado consistente com o conhecido efeito citotóxico do 5-FU sobre células de rápida proliferação, incluindo progenitores da medula óssea (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). O grupo L. plantarum + 5-FU apresentou contagens de plaquetas superiores às do grupo 5-FU, embora também tenha apresentado redução leucocitária em relação ao grupo Salina.

Esse resultado indica que, apesar de não reverter integralmente a mielossupressão induzida pelo quimioterápico, o L. plantarum exerceu um efeito parcialmente protetor sobre a linhagem plaquetária, o que pode estar relacionado à atenuação do quadro inflamatório sistêmico e à menor translocação bacteriana proporcionada pela preservação da barreira intestinal, um mecanismo já descrito para outras bactérias ácido-láticas em modelos de mucosite (CARVALHO et al., 2017).

HISTOPATOLOGIA INTESTINAL

A análise histopatológica, baseada nos escores adaptados de MacPherson e Pfeiffer (1978), demonstrou que o tratamento prévio com L. plantarum reduziu significativamente os escores de dano tecidual nos segmentos de duodeno ($p<0,01$) e íleo ($p<0,05$) em comparação ao grupo 5-FU. Os achados histológicos no grupo 5-FU foram caracterizados por atrofia de vilosidades, perda da arquitetura das criptas, infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema, enquanto o grupo tratado com o probiótico apresentou preservação mais evidente da arquitetura da mucosa.

Esse resultado está de acordo com a literatura, que descreve o papel de bactérias ácido-láticas na redução da apoptose epitelial, na promoção da proliferação de células das criptas e na atenuação da infiltração inflamatória em modelos de mucosite induzida por quimioterápicos (STRINGER et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2017). A preservação estrutural observada, especialmente no duodeno e no íleo, sugere que o L. plantarum atua diretamente sobre os mecanismos de dano epitelial desencadeados pelo 5-FU, possivelmente relacionada à modulação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória local.

PERFIL DE CITOCINAS (IL-1B E IL-10)

O grupo 5-FU apresentou aumento acentuado da citocina pró-inflamatória IL-1B ($p<0,05$) em relação ao grupo Salina, consistente com a ativação de vias inflamatórias mediadas por TLR-4 e NF- kappa B descrita na fisiopatologia da mucosite (LOGAN et al., 2007; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). O grupo L. plantarum + 5-FU atenuou significativamente os níveis de IL-1B e promoveu aumento expressivo da citocina anti-inflamatória IL-10 em comparação ao grupo 5-FU ($p<0,05$).

O equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias é determinante para a resolução do processo inflamatório intestinal. O aumento de IL-10 no grupo tratado com o probiótico indica um possível mecanismo regulador da resposta imune local, favorecendo a

resolução da inflamação e a preservação tecidual, um efeito imunomodulador já relatado para outras espécies de Lactobacillus em modelos de colite e mucosite (GEIER et al., 2007; YEUNG et al., 2013).

EXPRESSÃO GÊNICA DE NF-kB E ZO-1

A expressão do fator de transcrição pró-inflamatório NF-kB foi significativamente maior no grupo 5-FU em comparação ao grupo L. plantarum + 5-FU ($p<0,05$), reforçando o papel central dessa via na patogênese da mucosite intestinal (CHANG et al., 2012). Adicionalmente, o grupo L. plantarum + 5-FU apresentou maior expressão gênica de ZO-1 em relação aos grupos 5-FU e Salina ($p<0,05$), indicando preservação e possível reforço da integridade da barreira intestinal.

A manutenção da expressão de proteínas de junção estreita, como a ZO-1, é fundamental para impedir o aumento da permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana observada na mucosite (BISCHOFF et al., 2014). O aumento de ZO-1 associado à redução de NF-kB no grupo tratado sugere que o efeito protetor do L. plantarum envolve tanto a modulação da resposta inflamatória quanto o fortalecimento estrutural da barreira epitelial, mecanismos que atuam de forma integrada na proteção contra o dano induzido pelo 5-FU.

ANÁLISE METAGENÔMICA FECAL

A análise da abundância relativa da microbiota fecal demonstrou que o grupo *L. plantarum* + 5-FU apresentou aumento substancial da família Lactobacillaceae (81,89%) em relação ao grupo Salina (49,37%). Em contrapartida, o grupo 5-FU apresentou expansão da família de patógenos oportunistas Clostridiaceae (8,44%), a qual foi drasticamente contida no grupo *L. plantarum* + 5-FU (0,02%).

Esses achados são consistentes com o conhecido efeito do 5-FU sobre a diversidade e a composição da microbiota intestinal, favorecendo a disbiose e a expansão de gêneros potencialmente patogênicos (STRINGER et al., 2009; YUAN et al., 2018). A administração de L. plantarum, por sua vez, favoreceu a eubiose, com predomínio de bactérias ácido-láticas benéficas e contenção de patógenos oportunistas, corroborando o papel dos probióticos na restauração do equilíbrio microbiano após o dano induzido por quimioterápicos (DE OLIVEIRA et al., 2017; THURSBY; JUGE, 2017).

INTEGRAÇÃO DOS ACHADOS

Em conjunto, os resultados demonstram que a administração oral prévia de L. plantarum atenuou múltiplos aspectos da mucosite intestinal induzida por 5-FU, atuando de forma integrada em diferentes níveis: clínico (menor perda de peso), hematológico (preservação parcial de plaquetas), histológico (redução do dano tecidual em duodeno e íleo), imunológico (redução de IL-1B e NF- kappa B, aumento de IL-10), estrutural (aumento de ZO-1) e ecológico (restauração da microbiota, com aumento de Lactobacillaceae e contenção de Clostridiaceae). Esses achados reforçam o potencial do L. plantarum como estratégia adjuvante no manejo da mucosite intestinal induzida por quimioterapia, sendo necessários estudos futuros, incluindo ensaios clínicos, para confirmar sua aplicabilidade terapêutica em humanos.

Conclusão

A administração oral prévia de *Lactobacillus plantarum* desempenhou papel protetor contra a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos Swiss. Os resultados demonstram que esse efeito protetor envolve múltiplos mecanismos complementares: a preservação da arquitetura tecidual intestinal, especialmente em duodeno e íleo; a modulação da resposta inflamatória, com redução de IL-1B e do fator de transcrição NF- kappa B e estímulo à citocina anti-inflamatória IL-10; o fortalecimento da barreira epitelial, evidenciado pelo aumento da expressão de ZO-1; e a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, por meio do aumento de Lactobacillaceae e da contenção de Clostridiaceae, patógeno oportunista associado à disbiose induzida pelo 5-FU.

Esses achados reforçam o potencial do *Lactobacillus plantarum* como estratégia adjuvante no manejo da mucosite intestinal induzida por quimioterapia, contribuindo para a preservação da integridade intestinal e do equilíbrio microbiano durante o tratamento antineoplásico. Ainda assim, são necessários estudos complementares, incluindo a avaliação de outros marcadores inflamatórios e moleculares, bem como ensaios clínicos, para confirmar a aplicabilidade terapêutica desse probiótico em pacientes submetidos à quimioterapia com 5-FU, visando à melhoria da adesão ao tratamento e da qualidade de vida.

Referências

ARAÚJO, A. A. et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-α, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. Journal of Clinical Periodontology, v. 40, n. 12, p. 1104-1111, 2013.

ARIFIN, W. N.; ZAHIRUDDIN, W. M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. Malaysian Journal of Medical Sciences, v. 24, n. 5, p. 101-105, 2017.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2014, 2014.

BARBOSA, S. J. DE A. et al. The beneficial effects of Lacticaseibacillus casei on the small intestine and colon of Swiss mice against the deleterious effects of 5-fluorouracil. Frontiers in Immunology, v. 13, n. October, p. 1-12, 2022.

BISCHOFF, S. C. et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. BMC Gastroenterology, v. 14, n. 1, p. 1-25, 2014.

CARVALHO, R. D. D. O. et al. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: a focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. Frontiers in Microbiology, v. 8, n. MAY, p. 1-13, 2017.

CEBECI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. Food Microbiology, v. 20, n. 5, p. 511-518, 2003.

CHANG, C. T. et al. 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-κB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. PLoS ONE, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2012.

CHU, Z. X. et al. Lactobacillus plantarum prevents the upregulation of adhesion molecule expression in an experimental colitis model. Digestive Diseases and Sciences, v. 55, n. 9, p. 2505-2513, 2010.

DE OLIVEIRA, G. L. V. et al. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. Immunology, v. 152, n. 1, p. 1-12, 2017.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. International Journal of Cancer, v. 149, n. 4, p. 778-789, 2021.

GEIER, M. S. et al. Lactobacillus fermentum BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. International Journal of Food Microbiology, v. 114, n. 3, p. 267-274, 2007.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. Supportive Care in Cancer, v. 14, n. 9, p. 890-900, 2006.

GUICHARD, N. et al. Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. Analyst, v. 142, n. 13, p. 2273-2321, 2017.

HEIDELBERGER, C. et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. Nature, v. 179, p. 663-666, 1957.

KIM, S. H. et al. Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. Oncology Letters, v. 16, n. 2, p. 2585-2590, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOGAN, R. M. et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. Cancer Treatment Reviews, v. 33, n. 5, p. 448-460, 2007.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. Digestion, v. 17, n. 2, p. 135-150, 1978.

OLIVEIRA, M. M. B. et al. Losartan improves intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. Scientific Reports, v. 11, p. 1-13, 2021.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 93, n. March, p. 52-79, 2015.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. British Journal of Pharmacology, v. 115, n. 7, p. 1265-1275, 1995.

STRINGER, A. M. et al. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. Journal of Supportive Oncology, v. 5, n. 6, p. 259-267, 2007.

STRINGER, A. M. et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. Experimental Biology and Medicine, v. 234, n. 4, p. 430-441, 2009.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. Biochemical Journal, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

YEUNG, C. Y. et al. In vitro prevention of salmonella lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various lactobacillus strains. Gastroenterology Research and Practice, v. 2013, p. 1-6, 2013.

YUAN, L. et al. The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 108, n. August, p. 184-193, 2018.

Anexos



Tabela 01: Resumo da Distribuição das Famílias (%)



Imagem histopatológica: cortes dos fragmentos em Hematoxilina e Eosina no aumento de 20x.

CÓDIGO: SB0376

AUTOR: CAMILLE SOUZA ROCHA

COAUTOR: THOMAZ GABRIEL BARROS DA ROCHA

ORIENTADOR: GISLENE MARIA DA SILVA GANADE

TÍTULO: Efeitos da diversidade sobre o desempenho e a herbivoria de Libidibia ferrea em comunidades restauradas na Caatinga

Resumo

As atividades antrópicas têm promovido a degradação dos ecossistemas e acelerado a perda da biodiversidade, tornando a restauração ecológica uma estratégia urgente. Nesse contexto, experimentos de biodiversidade e funcionamento ecossistêmico demonstram que a diversidade de espécies favorece o desempenho das árvores por mecanismos como complementaridade e facilitação, além de modificar as interações com herbívoros. Nosso objetivo foi testar os efeitos da riqueza arbórea e da facilitação entre árvores sobre o desempenho e a herbivoria de Libidibia ferrea em comunidades restauradas. O estudo foi conduzido dentro do experimento BrazilDry de restauração, que utiliza a biodiversidade de árvores para avaliar modelos de restauração na Caatinga. A partir do terceiro ano de restauração, a facilitação aumentou a sobrevivência de L. ferrea, enquanto o crescimento foi favorecido pela riqueza de árvores vizinhas. A riqueza de espécies e a herbivoria em árvores vizinhas também influenciaram a herbivoria em L. ferrea. Portanto, a diversidade e as interações entre plantas contribuem para o desempenho de florestas restauradas, como o crescimento e a sobrevivência das árvores, além da manutenção das interações com níveis tróficos superiores. Nossos resultados reforçam a importância da biodiversidade para apoiar o uso de espécies de árvores nativas como modelos eficazes para a restauração da Caatinga.

Palavras-chave: Restauração ecológica. Sucessão ecológica. Biodiversidade. Jucá.

TITLE: Effects of tree diversity on Libidibia ferrea performance and leaf herbivory in restored Caatinga tree communities

Abstract

Anthropogenic activities have promoted ecosystem degradation and increased biodiversity loss, highlighting the ecological restoration as an urgent strategy. In this context, biodiversity–ecosystem functioning experiments have shown that species diversity can enhance tree performance through mechanisms such as complementarity and facilitation, while also modifying plant–herbivore interactions. Our objective was to test the effects of tree species richness and facilitation on the performance and herbivory of Libidibia ferrea in restored communities. The study was conducted within the BrazilDry restoration experiment, which uses tree biodiversity to evaluate restoration models in the Caatinga. Beginning in the third year of restoration, facilitation increased the survival of L. ferrea, whereas growth was enhanced by the richness of neighboring trees. Neighboring tree species richness and herbivory also influenced herbivory in L. ferrea. Therefore, plant diversity and plant–plant interactions contribute to the performance of restored forests, including tree growth and survival, as well as to the maintenance of interactions with higher trophic levels. Our results reinforce the importance of biodiversity in supporting the use of native tree species as effective models for Caatinga restoration

Keywords: Ecological restoration. Ecological succession. Biodiversity. Jucá.

Introdução

As atividades antrópicas têm promovido a degradação de ecossistemas em escala global, reduzindo a biodiversidade e comprometendo processos essenciais ao funcionamento dos ecossistemas. Diante desse cenário, a Organização das Nações Unidas instituiu a Década da Restauração de Ecossistemas (2019–2030), destacando a necessidade de desenvolver estratégias capazes de restaurar não apenas a cobertura vegetal, mas também os processos e interações ecológicas que sustentam a estabilidade e a provisão de serviços ecossistêmicos (UNITED NATIONS, 2019). Nesse contexto, a diversificação das comunidades plantadas tem sido apontada como uma estratégia capaz de aumentar a resiliência e a multifuncionalidade de florestas restauradas, uma vez que diferentes espécies podem desempenhar funções complementares e responder de maneira distinta às condições ambientais (MESSIER et al., 2022).

Experimentos de biodiversidade e funcionamento ecossistêmico foram implementados em diferentes florestas no mundo com o objetivo de compreender como a diversidade de árvores influencia o funcionamento das comunidades. Esses experimentos fornecem uma importante base para compreender como diferentes níveis de riqueza podem afetar processos ecológicos e orientar modelos de restauração (PAQUETTE et al., 2018; LIU et al., 2026). Os efeitos positivos da diversidade sobre o funcionamento das comunidades podem ocorrer por diferentes mecanismos. A complementaridade está relacionada à utilização diferencial dos recursos pelas espécies, de modo que espécies com diferentes estratégias ecológicas podem explorar recursos de maneira mais eficiente e reduzir a sobreposição na competição (WAGG et al. 2017). Já a facilitação ocorre quando uma espécie melhora o microclima e as condições do solo de forma a favorecer o crescimento

ou a sobrevivência de outras espécies (FAGUNDES et al., 2018; TROGISCH et al., 2021; FAGUNDES et al., 2023).

Além das interações entre plantas, a herbivoria constitui um importante processo ecológico capaz de influenciar o desempenho das comunidades vegetais. Os herbívoros participam do fluxo de energia entre níveis tróficos e podem alterar o crescimento, a sobrevivência e a composição das comunidades vegetais (BARNES et al. 2020). A intensidade desses danos pode variar em função da diversidade vegetal, uma vez que comunidades mais diversas podem modificar a localização e a concentração dos recursos utilizados pelos herbívoros e também alterar a atuação de seus inimigos naturais (GUYOT et al., 2019). A hipótese da concentração de recursos propõe que a maior concentração de plantas hospedeiras pode facilitar sua localização pelos herbívoros, enquanto a hipótese dos inimigos naturais sugere que comunidades vegetais mais diversas podem favorecer predadores e parasitóides, aumentando a pressão sobre os herbívoros (ROOT 1973; STAAB & SCHULDT 2020). Assim, a diversidade vegetal pode modificar não apenas o desempenho das plantas, mas também as interações entre diferentes níveis tróficos.

Dessa forma, compreender simultaneamente os efeitos da diversidade sobre o desempenho das plantas e sobre suas interações com herbívoros é fundamental para o desenvolvimento de modelos de restauração mais eficientes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo testar como a riqueza de espécies arbóreas e a facilitação entre árvores afetam o crescimento, a sobrevivência e a herbivoria de Libidibia ferrea ao longo de nove anos de restauração da Caatinga. Especificamente, buscamos avaliar se o aumento da riqueza arbórea favorece o desempenho de L. ferrea e sua interação com herbívoros. A partir dos resultados obtidos, buscamos contribuir para a compreensão dos mecanismos ecológicos envolvidos no funcionamento de comunidades restauradas e para a proposição de modelos de restauração que incorporem espécies nativas da Caatinga.

Metodologia

2.1 Área de estudo e delineamento experimental

O estudo foi desenvolvido no experimento BrazilDry, implementado na Floresta Nacional de Açu (FLONA de Açu), município de Açu, Rio Grande do Norte, Brasil (5,58° S; 36,95° W). O experimento foi estabelecido para investigar os efeitos da diversidade de espécies e as interações de facilitação entre árvores sobre o funcionamento de comunidades restauradas em uma floresta sazonalmente seca. O BrazilDry é composto por 16 espécies arbóreas nativas da Caatinga, distribuídas em 147 comunidades experimentais **(Figura 1)**, submetidas a cinco níveis de riqueza de espécies (1, 2, 4, 8 e 16 espécies). Para o presente estudo, Libidibia ferrea (Mart. ex Tul. L.P. Queiroz) foi utilizada como espécie modelo, considerando sua ampla distribuição e importância no bioma Caatinga. A espécie está representada por 294 indivíduos distribuídos em 36 parcelas experimentais. A facilitação entre plantas foi mensurada antes da implementação do BrazilDry por Fagundes et al. (2018), que testou o potencial de cada uma das 16 espécies do experimento em facilitar o crescimento e a sobrevivência de mudas de árvores nativas. Após isso, o experimento foi implementado montando comunidades com um

gradiente de interações entre árvores. Dessa forma, o experimento possui comunidades com árvores facilitadoras e competidoras.

2.2 Avaliação do desempenho e da herbivoria

Durante o desenvolvimento das comunidades, foram monitoradas a sobrevivência e o crescimento em altura dos indivíduos de L. ferrea entre 2017 e 2025. A herbivoria foliar foi avaliada em campanhas realizadas nos anos iniciais da restauração (2017–2018) e em estágios mais avançados (2024–2025), permitindo avaliar a variação das interações planta–herbívoro ao longo do desenvolvimento das comunidades.

Para a avaliação da herbivoria, foram amostradas folhas localizadas nas regiões mais apical e basal das árvores. Os danos foliares foram classificados em quatro tipos: mastigação, sucção, raspagem e mineração. A intensidade dos danos foi estimada a partir de classes de porcentagem de área foliar afetada (0; 1–5; 6–10; 11–25; 26–50; 51–75; 76–99 e 100%), posteriormente convertidas em seus respectivos valores medianos para as análises.

2.3 Análises estatísticas

Para expressar os incrementos de crescimento, sobrevivência e herbivoria, calculamos os efeitos líquidos, que foram estimados como a diferença entre os valores observados nas comunidades diversas e os valores observados nas comunidades de monoculturas. Dessa forma, valores positivos indicam maior crescimento, sobrevivência e herbivoria nas comunidades diversas, enquanto valores negativos enfatizam maior desempenho em monoculturas. As análises estatísticas foram realizadas no software R por meio de Modelos Lineares Mistos. Para avaliar o desempenho de L. ferrea, foram analisados os efeitos da riqueza de espécies arbóreas, da facilitação entre plantas e dos anos após a restauração sobre a sobrevivência e o crescimento. Para a análise da herbivoria, além das variáveis experimentais, foi incluída a herbivoria observada nas espécies vizinhas como potencial indicador de efeitos associados à vizinhança vegetal. Como variáveis randômicas incluímos a composição de espécies e as parcelas aninhadas dentro das composições.

Resultados e Discussões

3.1 Sobrevivência

O potencial de facilitação entre as árvores aumentou a sobrevivência de Libidibia ferrea ao longo do tempo, com efeitos positivos observados principalmente a partir do terceiro ano após a restauração **(Figura 2; Tabela 1)**. Esse resultado indica que a importância das interações positivas entre plantas pode aumentar à medida que as comunidades arbóreas se desenvolvem. Em ambientes sazonalmente secos, onde a disponibilidade de água representa uma importante limitação ao estabelecimento vegetal, alterações nas condições microambientais promovidas por espécies vizinhas podem favorecer a sobrevivência de outras plantas (FAGUNDES et al. 2018).

3.2 Crescimento

A riqueza de espécies arbóreas e os anos após a restauração afetaram positivamente o incremento líquido de crescimento de L. ferrea**(Figura 3; Tabela 2)**. Esse resultado demonstra que o desempenho da espécie foi favorecido em comunidades com maior riqueza e que esse efeito se tornou mais evidente com o desenvolvimento das comunidades ao longo do tempo. O aumento do crescimento em comunidades mais diversas é consistente com a teoria de biodiversidade e funcionamento ecossistêmico. Uma possível explicação é a ocorrência de complementaridade entre espécies, na qual diferentes árvores apresentam estratégias distintas de aquisição e utilização de recursos, reduzindo a sobreposição na competição e aumentando a eficiência do uso de recursos pela comunidade (TROGISCH et al., 2021). Esse resultado possui implicações diretas para a restauração, pois demonstra que o desempenho de uma espécie depende de mecanismos associados à complementaridade durante o processo de estruturação das comunidades restauradas. Dessa forma, a diversificação dos plantios de restauração pode favorecer a manutenção das comunidades e a multifuncionalidade das florestas restauradas ao longo do tempo (MESSIER et al., 2022).

3.3 Herbivoria

A riqueza de espécies arbóreas, a herbivoria observada nas árvores vizinhas e os anos após a restauração influenciaram positivamente a herbivoria de L. ferrea**(Figura 4; Tabela 3)**. O aumento da herbivoria indica que a interação planta–herbívoro varia conforme a vizinhança arbórea. Nesse sentido, esse padrão pode ocorrer uma vez que as comunidades mais diversas contribuem para a colonização de diferentes grupo tróficos, como insetos generalistas, que podem utilizar diferentes plantas como fontes de recursos (BERNAYS & BRIGHT, 1993; UNSICKER ET AL., 2008). Além disso, a relação positiva entre a herbivoria de L. ferrea e a herbivoria observada nas árvores vizinhas também sugere um mecanismo de suscetibilidade associativa entre espécies (CASTAGNEYROL ET AL. 2013; JACTEL ET AL. 2021). Esses resultados evidenciam que as interações tróficas precisam ser consideradas na avaliação do funcionamento das comunidades restauradas. Portanto, a variação ao longo dos anos também indica que as interações planta–herbívoro se modificam durante o desenvolvimento das comunidades. À medida que a vegetação cresce e se torna estruturalmente mais complexa, mudanças na disponibilidade de recursos e na composição dos organismos associados podem alterar a pressão de herbivoria (TROGISCH et al. 2021). Dessa forma, a restauração da biodiversidade pode resultar não apenas no estabelecimento de árvores, mas também no restabelecimento gradual das interações tróficas características das comunidades vegetais.

Conclusão

Ao longo de nove anos de restauração, a diversidade de árvores influenciou diferentes componentes do desempenho e as interações ecológicas com insetos herbívoros. A facilitação contribuiu para a sobrevivência de L. ferrea após a restauração, enquanto a maior riqueza de espécies favoreceu o seu crescimento. Além disso, a vizinhança arbórea aumentou a herbivoria em L. ferrea ao longo do tempo. Esses resultados demonstram que

a diversidade vegetal atua simultaneamente sobre processos de estabelecimento, crescimento e interações tróficas, reforçando a importância de incorporar a diversidade de espécies e as interações entre plantas nos modelos de restauração da Caatinga. Nesse contexto, L. ferrea apresenta potencial para utilização em comunidades restauradas, especialmente em estratégias que considerem a associação entre espécies e a formação de comunidades funcionalmente diversas.

Referências

BARNES, A. D.; SCHERBER, C.; BROSE, U. et al. Biodiversity enhances the multitrophic control of arthropod herbivory. Science Advances, v. 6, eabb6603, 2020.

BERNAYS, E. A.; BRIGHT, K. L. Mechanisms of dietary mixing in grasshoppers: a review. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 104, n. 1, p. 125–131, 1993. DOI:https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90019-Z.

CASTAGNEYROL, B.; GIFFARD, B.; PÉRÉ, C.; JACTEL, H. Plant apparency, an overlooked driver of associational resistance to insect herbivory. Journal of Ecology, v. 101, n. 2, p. 418–429, 2013. DOI:https://doi.org/10.1111/1365-2745.12055.

FAGUNDES, M.; MAZZOCHINI, G. G.; GANADE, G. The role of plant diversity and facilitation during tropical dry forest restoration. Journal of Ecology, v. 111, p. 1231–1241, 2023.

FAGUNDES, M.; WEISSER, W.; GANADE, G. The role of nurse successional stages on species-specific facilitation in drylands: nurse traits and facilitation skills. Ecology and Evolution, v. 8, p. 5173–5184, 2018.

GUYOT, V. et al. Tree diversity drives associational resistance to herbivory at both forest edge and interior. Ecology and Evolution, v. 9, n. 16, p. 9040–9051, 2019. DOI:https://doi.org/10.1002/ece3.5450.

JACTEL, H.; MOREIRA, X.; CASTAGNEYROL, B. Tree diversity and forest resistance to insect pests: patterns, mechanisms, and prospects. Annual Review of Entomology, v. 66, n. 1, p. 277–296, 2021. DOI:https://doi.org/10.1146/annurev-ento-041720-075234.

LI, Y. et al. Plant diversity enhances ecosystem multifunctionality via multitrophic diversity. Nature Ecology & Evolution, v. 8, p. 2037–2047, 2024.

LIU, X. et al. Ecological insights from three decades of forest biodiversity experiments. Nature Reviews Biodiversity, v. 2, p. 9–23, 2026. DOI:https://doi.org/10.1038/s44358-025-00112-2.

MESSIER, C. et al. For the sake of resilience and multifunctionality, let's diversify planted forests. Conservation Letters, v. 15, e12829, 2022.

PAQUETTE, A. et al. A million and more trees for science. Nature Ecology & Evolution, v. 2, p. 763–766, 2018. DOI:https://doi.org/10.1038/s41559-018-0544-0.

ROOT, R. Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (Brassica oleracea). Ecological Monographs, v. 43, n. 1, p. 95–124, 1973.

STAAB, M.; SCHULDT, A. The influence of tree diversity on natural enemies—the "Enemies" hypothesis in forests. Current Forestry Reports, v. 6, p. 243–259, 2020.

TROGISCH, S. et al. The significance of tree-tree interactions for forest ecosystem functioning. Basic and Applied Ecology, v. 55, p. 33–52, 2021. DOI:https://doi.org/10.1016/j.baae.2021.02.003.

UNITED NATIONS GENERAL ASSEMBLY. United Nations Decade on Ecosystem Restoration (2021–2030). Resolution A/RES/73/284, adopted on 1 Mar. 2019. New York: United Nations, 2019.

Anexos



Figura 1 – Experimento de biodiversidade arbórea localizada na maior floresta tropical sazonalmente seca da América do Sul (A). Distribuição das 155 parcelas do experimento Brazil Dry em função do gradiente de riqueza de espécies arbóreas (B).



Figura 2. Efeito da facilitação entre árvores sobre o incremento de sobrevivência em altura de L. ferrea. Pontos representam as comunidades experimentais, e linhas os efeitos dos modelos lineares mistos com IC de 95%.



Figura 3. Efeitos da riqueza de espécies e do tempo após a restauração sobre o incremento de crescimento em altura de L. ferrea. Pontos representam as comunidades experimentais, e linhas os efeitos dos modelos lineares mistos com IC de 95%.



Figura 4. Efeitos da riqueza, herbivoria nas espécies vizinhas e tempo sobre o incremento de herbivoria foliar em L. ferrea. Linhas indicam os efeitos dos modelos, com IC de 95%.



Tabela 1 – Efeitos das variáveis experimentais sobre a sobrevivência de L. ferrea pelo modelo linear misto. SS = somatório dos quadrados; df e dendf = graus de liberdade. Valores de p significativos em negrito. Riqueza transformada em log2.



Tabela 2 – Efeitos das variáveis experimentais sobre o crescimento de L. ferrea pelo modelo linear misto. SS = somatório dos quadrados; df e dendf = graus de liberdade. Valores de p significativos em negrito. Riqueza transformada em log2.



Tabela 3 – Efeitos das variáveis experimentais sobre a herbivoria de L. ferrea pelo modelo linear misto. SS = somatório dos quadrados; df e dendf = graus de liberdade. Valores de p significativos em negrito. Riqueza transformada em log2.

CÓDIGO: SB0421

AUTOR: MARIA EDUARDA NICÁCIO GALVÃO

COAUTOR: LUAN SOUZA DA FONSECA

ORIENTADOR: GISLENE MARIA DA SILVA GANADE

TÍTULO: DINÂMICA DA REGENERAÇÃO DE ÁRVORES DE INTERESSE ECONÔMICO EM UMA ÁREA RESTAURADA.

Resumo

A regeneração natural é influenciada por filtros como a predação de sementes, enquanto a diversidade de espécies e a facilitação podem modificar as condições ambientais e as interações ecológicas que determinam o recrutamento vegetal. Este estudo avaliou como esses fatores influenciam a regeneração de *Copernicia prunifera* em uma área restaurada da Caatinga, testando se a interação entre diversidade e facilitação melhora a emergência, sobrevivência, crescimento e biomassa de plântulas, ao mesmo tempo que aumenta a predação de sementes. O experimento foi conduzido na Floresta Nacional de Açu (RN), com 465 plântulas transplantadas e 1.550 sementes distribuídas em 155 parcelas e monitoradas por três meses. Foram avaliadas sobrevivência, altura, número de folhas e predação de sementes, utilizando GLMMs para testar os efeitos da diversidade e facilitação. Apenas 46 plântulas sobreviveram, sem efeitos significativos da diversidade ou facilitação sobre a sobrevivência e altura. Foram predadas 158 sementes, com maior número em comunidades com duas espécies e monoculturas. A baixa pluviosidade, elevada incidência solar e escassez hídrica podem explicar os resultados. O estudo evidencia a complexidade dos fatores que condicionam a regeneração na Caatinga e reforça a importância de integrar espécies de relevância socioeconômica e facilitadoras em estratégias de restauração.

Palavras-chave: Caatinga. Restauração. Regeneração. Predação. Diversidade.Facilitação.

TITLE: Regeneration dynamics of economically important trees in a restored area.

Abstract

Natural regeneration is influenced by filters such as seed predation, while species diversity and facilitation can modify environmental conditions and ecological interactions that determine plant recruitment. This study evaluated how these factors influence the

regeneration of *Copernicia prunifera* in a restored area of the Caatinga, testing whether the interaction between diversity and facilitation improves seedling emergence, survival, growth and biomass, while increasing seed predation. The experiment was conducted at the Açu National Forest (RN), with 465 seedlings transplanted and 1,550 seeds distributed across 155 plots and monitored for three months. Seedling survival, height, leaf number and seed predation were assessed using GLMMs to test the effects of diversity and facilitation. Only 46 seedlings survived, with no significant effects of diversity or facilitation on survival and height. A total of 158 seeds were predated, with the highest numbers in two-species communities and monocultures. Low rainfall, high solar incidence and water scarcity may explain the results. The study highlights the complexity of factors conditioning regeneration in the Caatinga and reinforces the importance of integrating socioeconomically relevant and facilitator species into restoration strategies.

Keywords: Caatinga. Restoration. Regeneration. Predation. Diversity.Facilitation

Introdução

A restauração ecológica visa assistir à recuperação de ecossistemas degradados, restabelecendo funcionalidade, biodiversidade nativa e serviços ecossistêmicos (Pinto et al., 2025). As ações de restauração não se limitam ao estabelecimento da comunidade vegetal, mas também ao fortalecimento de processos ecológicos como dispersão, germinação, estabelecimento e recrutamento (Holmes et al., 2000). A regeneração natural torna-se indicador de sucesso, permitindo o recrutamento e estabelecimento de novos indivíduos e contribuindo para a recuperação da biodiversidade e funções ecossistêmicas (Williams et al., 2024).

A regeneração natural é influenciada por fatores bióticos e abióticos e depende da superação de filtros ambientais ligados à disponibilidade de diásporos, distância de matrizes doadoras, predação e microclima (Chazdon, 2013; Viani et al., 2015). Características das sementes, condições ambientais e interações com organismos determinam o sucesso da germinação e estabelecimento, com grandes perdas nas fases iniciais (Naruangsri et al., 2023). A predação de sementes constitui um filtro pré-germinativo, reduzindo a disponibilidade de propágulos e limitando o recrutamento (Castro et al., 2023; Drescher et al., 2023; Joyce et al., 2024). Sementes são recursos essenciais para diversos organismos, mas quando removidas ou danificadas reduzem a quantidade de propágulos disponíveis, atuando como filtro pré-estabelecimento (Joyce et al., 2024). A intensidade da predação varia conforme características das sementes, ambiente e comunidade vegetal (Schoepf et al., 2023). Evidências mostram que a diversidade e composição das espécies podem modificar a predação e seu efeito sobre o recrutamento (Drescher et al., 2023; Costa et al., 2024). A composição vegetal ao redor das sementes pode influenciar interações com predadores e os processos de regeneração.

A diversidade de espécies arbóreas altera a estrutura e funcionamento das comunidades, modificando condições ambientais, disponibilidade de recursos e interações ecológicas que influenciam a regeneração (Fagundes et al., 2023). A facilitação permite que plantas resistam a condições de estresse severo, com espécies facilitadoras modificando o microclima e criando condições favoráveis ao estabelecimento de outras espécies (Paterno et al., 2016; Fagundes et al., 2018). Essas mudanças afetam interações entre sementes e consumidores, embora os efeitos sobre a predação dependam da composição da comunidade (Drescher et al., 2023). Diversidade e facilitação podem atuar

mutuamente sobre os estágios da regeneração, desde a sobrevivência das sementes até o estabelecimento e crescimento das plantas.
A Caatinga é um bioma sazonalmente seco, com 912.000 km², marcado por escassez hídrica e alta radiação solar (Queiroz et al., 2017; Silva & Souza, 2018). Atividades humanas como pecuária e queimadas comprometem a biodiversidade e os processos de regeneração (Antongiovanni et al., 2020; Menezes et al., 2024). Investigar esses processos é fundamental para o sucesso da restauração.
A Carnaúba (*Copernicia prunifera*), palmeira endêmica, possui relevância socioeconômica e ambiental: sua cera é usada na indústria cosmética e seu óleo para biolubrificantes (Silva et al., 2025; Reis et al., 2011). Sua inclusão na restauração gera renda por extrativismo sustentável e preserva a identidade cultural (Gonçalves et al., 2020). Estratégias de restauração devem associar biodiversidade e facilitação para otimizar o recrutamento de plântulas como indicadores de sucesso ecológico.
Este trabalho objetiva entender a influência da diversidade e facilitação na emergência de plântulas de Carnaúba e seu banco de sementes em área restaurada da Caatinga, com as hipóteses: (1) diversidade e facilitação influenciam a emergência, sobrevivência, crescimento e biomassa de plântulas; (2) diversidade e facilitação aumentam a predação de sementes.

Metodologia

Local de estudo – O estudo foi conduzido na Floresta Nacional de Açu (FLONA de Açu), localizada no município de Açu, Rio Grande do Norte (05º35'2"S, 36º56'42"O). A unidade de conservação possui 413,52 ha e representa um remanescente de vegetação nativa em região fortemente antropizada. A região apresenta forte sazonalidade, com precipitação média de 550 a 750 mm/ano, restrita a quatro meses de estação chuvosa (fevereiro a junho), com chuvas irregulares. A temperatura média varia entre 32 e 37°C, e a temperatura do solo pode ultrapassar 45°C na estação seca (EMPARN, 2026; Neto et al., 2025).
Coleta das sementes e produção em casa de vegetação – As sementes foram obtidas por coletores em matrizes da espécie-alvo nos arredores da FLONA de Açu. O beneficiamento foi realizado no Laboratório de Ecologia da Restauração (LER/UFRN) e no Centro Imburana de Restauração da Caatinga (CIRCA), com remoção manual de sementes danificadas ou com indícios de predação pré-dispersão, e armazenamento em refrigerador (4°C a 10°C) para preservação da viabilidade. Foram produzidas 465 plântulas em casa de vegetação com milimitragem do sombrite de 70% de sombreamento, e separadas 1.550 sementes para o banco de sementes. *Delineamento amostral* – O experimento foi instalado em área degradada cedida pela FLONA de Açu, com aproximadamente 3,3 ha, anteriormente área de pastejo (5º32'20"S, 36º56'42"W), com 15 anos de abandono sem regeneração natural da vegetação arbórea e 10 anos em processo de restauração. O local abriga o experimento de biodiversidade e funcionamento do ecossistema (BEF) BrazilDry, integrante da rede TreeDivNet (treedivnet.ugent.be), que testa a relação entre diversidade de espécies arbóreas e o funcionamento de ecossistemas (Paquette et al., 2018). As parcelas experimentais medem 12 x 8 m, com mudas de 16 espécies arbóreas nativas da região (Tabela 1), cujo potencial facilitador foi testado experimentalmente (Fagundes et al., 2018). As mudas apresentavam cerca de 0,5 m de altura e 1 m de raiz (Figura 2), com espaçamento de 1,86 m. Seis níveis de diversidade foram estabelecidos: controle (sem mudas), monoculturas e misturas com 2, 4, 8 e 16 espécies, cada parcela com 32 indivíduos arbóreos. As composições foram geradas

aleatoriamente para cada nível, com três repetições, totalizando 48 parcelas de monocultura, 48 de 2 espécies, 24 de 4 espécies, 12 de 8 espécies, 15 de 16 espécies e 8 controles, totalizando 155 parcelas. No centro das parcelas, foram delimitados três quadrats de 0,5 x 0,5 m, excluindo o centro, divididos e enumerados de 1 a 8, sorteados de forma não perpendicular. As plântulas foram transplantadas em cada quadrat, e 10 sementes foram colocadas em um deles, enumeradas de 1 a 10 com palitos de picolé para localização em campo (Figura 3). Durante maio a julho, foram monitoradas a sobrevivência, altura e número de folhas das plântulas, e as sementes foram observadas para predação.

Análise estatística – Para testar os efeitos da diversidade e da facilitação sobre a sobrevivência, crescimento das plântulas e predação de sementes, utilizamos Modelos Mistos Lineares Generalizados (GLMM). As variáveis resposta (Y) foram sobrevivência, altura média, número de folhas e número de sementes predadas; as variáveis preditoras (X) foram diversidade de espécies arbóreas e potencial de facilitação. As análises foram realizadas no R Studio (versão 2026.05.0) com os pacotes ggplot2, dplyr, tidyr e glmmTMB.

Resultados e Discussões

Resultados - Apenas 46 plântulas transplantadas sobreviveram, representando 10,6% do total de sobrevivência. Não houve diferença significativa da diversidade sobre a sobrevivência das plântulas de Carnaúba (Figura 4; $p = 0.562$), assim como não foi observado efeito significativo da facilitação (Figura 5; $p = 0.811$). A interação entre diversidade e facilitação também não foi significativa ($p = 0.950$), apontando que o efeito da facilitação sobre a sobrevivência não dependeu do nível de diversidade (Tabela 2). Também não houve efeito significativo da diversidade sobre a altura média das plântulas após 50 dias (Figura 6; $p = 0.612$) e da facilitação (Figura 7; $p = 0.573$). Da mesma forma a interação entre a diversidade e facilitação não diferiram significativamente ($p = 0.723$). Com isso, a diversidade, a facilitação e sua interação não influenciaram o crescimento em altura das plântulas de Carnaúba (Tabela 3). Para a predação das sementes, foram predadas no total de 158 sementes (Tabela 4), concentrando nas comunidades com 2 espécies (65 sementes) em seguida nas monoculturas (41 sementes) (Figura 9). Não foram observadas diferenças significativas da diversidade ($p = 0.442$), facilitação ($p = 0.169$) e suas interações ($p = 0.258$) (Tabela 5).

Discussão - Ainda que a diversidade de espécies nas comunidades e a facilitação não teve efeito significativo, podemos observar que a taxa de sobrevivência sobressai de forma relativa em monoculturas e em comunidades que abrigam maior diversidade arbórea após 50 dias do plantio. A baixa pluviosidade, alta incidência solar e a escassez hídrica entre os meses após a implementação são os pontos principais para a redução da sobrevivência, consequentemente também para a altura média desses indivíduos. As plântulas que permanecem sobrevivendo nessas comunidades utilizam recursos de algumas espécies que ainda se mantêm ativos durante a estação seca, como por exemplo do Joazeiro (*Sarcomphalus joazeiro*) que fornece umidade ao solo com suas raízes profundas e por ser uma espécie perenifólia disponibiliza sombreamento, afetando positivamente o crescimento e desenvolvimento inicial das plântulas em campo (Reis et al., 2011). Outro ponto importante é a presença da fauna que se alimenta do órgão de reserva energética da Carnaúba, semente que fica localizada entre a parte aérea e as raízes da planta, que possui alto conteúdo energético, sendo deles o tatu peba (*Euphractus sexcinctus*) muito presente

na região.Com a retirada da reserva na plântula, as chances de sobrevivência são mínimas se suas raízes não estiverem fixadas ao solo. Quanto à predação, não houve efeitos significativos da diversidade e facilitação. Os maiores números de sementes predadas foram registradas em monoculturas e em comunidades com 2 espécies plantadas e menores registros em comunidades com 16, 4 e 8 espécies. Esse resultado mostra que a diversidade pode não ser suficiente para explicar a intensidade da predação, uma vez que outros fatores ligados a estrutura da comunidade e as composições podem variar a atividade dos consumidores (Hertzog et al., 2017). Dependendo das suas características, as comunidades com composições de duas espécies podem produzir uma estrutura de habitat favorável aos predadores (roedores, formigas ou outros granívoros) que comunidades com maior riqueza, nas quais a estrutura vegetal pode ser diferente. Além disso, a identidade das espécies presentes pode ser importante, pois diferentes espécies vegetais podem alterar a disponibilidade de abrigo, umidade, cobertura do solo e recursos alimentares para os predadores. Em comunidades sem mudas plantadas houve baixa predação, característica observada em estudo que os predadores tendem a evitar locais muito abertos, que apresentam um risco de ataque por predadores (Osunkoya,1994). O estresse hídrico influencia o banco de sementes, reduzindo o teor de água disponível na semente e o valor nutricional delas.

Conclusão

A baixa pluviosidade afetou a sobrevivência, crescimento e a predação da *Copernicia prunifera*. Reforçamos a importância de se utilizar espécies de importância social e econômica juntamente com espécies nativas facilitadoras e enfermeiras na restauração em um bioma que durante um período do ano é tão limitado pela imprevisibilidade de chuvas. Apesar dos resultados não esperados, este estudo trouxe um tema pouco explorado envolvendo a espécie-alvo e seus processos de regeneração e predação em comunidades restauradas com presença de espécies nativas facilitadoras que promovem auxílio, crescimento e produtividade para a sociedade.

Referências

ANTONGIOVANNI, Marina; VENTICINQUE, Eduardo M.; MATSUMOTO, Marcelo; FONSECA, Carlos Roberto. Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. Journal of Applied Ecology, v. 57, p. 2064-2074, 2020.

CASTRO, J. et al. A restauração florestal é mais do que disparar sementes de um drone.Restoration Ecology, v. 31, p. e13736, 2023.

CHAZDON, R. L. Making Tropical Succession and Landscape Reforestation Successful. Journal of Sustainable Forestry, v. 32, n. 7, p. 649-658, 2013.

DRESCHER, B. J.; NOLAN, M. Does increasing the diversity of seeds broadcast for restoration alter post-dispersal seed predation and its community-determining effects? Ecological Solutions and Evidence, v. 4, n. 3, 2023.

EMPARN – Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. Banco de Dados Meteorológicos. Natal, RN: EMPARN, 2026. Disponível em: http://www.emparn.rn.gov.br.

FAGUNDES, M. V. et al. The role of nurse successional stages on species-specific facilitation in drylands: Nurse traits and facilitation skills. Ecology and Evolution, v. 8, n. 10, p. 5173–5184, 2018.

FAGUNDES, M. V. et al. The role of plant diversity and facilitation during tropical dry forest restoration. Journal of Ecology, 2023. No prelo.

GANADE, G. et al. Testing multiple restoration strategies in Caatinga drylands: the importance of long roots.Journal of Applied Ecology, [S.l.], no prelo. (em preparação)

GONÇALVES, M. P. M. et al. Desenvolvimento em campo de espécies da Caatinga com o uso de resíduos de carnaúba.Revista Brasileira de Desenvolvimento, v. 6, n. 1, p. 1188–1200, 2020.

HERTZOG, L. R.; EBELING, A.; WEISSER, W. W.; MEYER, S. T. Plant diversity increases predation by ground-dwelling invertebrate predators. Ecosphere, v. 8, n. 11, p. e01990, 2017.

HOLMES, P. M. et al. Protocols for Restoration Based on Recruitment Dynamics, Community Structure, and Ecosystem Function: Perspectives from South African Fynbos. Restoration Ecology, v. 7, p. 215–230, 2000.

JOYCE, F. H. et al. Vertebrate seed predation can limit recruitment of later-successional species in tropical forest restoration. Biotropica, v. 56, p. e13381, 2024.

MENEZES, A. G. S. et al. Negative effects of human disturbance and increased aridity on root biomass and nutrients along the regeneration of a tropical dry forest in the context of slash-and-burn agriculture. Science of The Total Environment, 2024. No prelo.

NARUANGSRI, K. et al. Differential seed removal, germination and seedling growth as determinants of species suitability for forest restoration by direct seeding – A case study from northern Thailand. Forest Ecosystems, v. 10, p. 100133, 2023.

NETO, J. D. C. et al. Climate change in the Potiguar Caatinga: analysis of thermal and rainfall trends and the climatic water balance in Assú (1950–2024). Contribuciones a Las Ciencias Sociales, São José dos Pinhais, v. 19, n. 1, p. 01-29, 2026.

OSUNKOYA, O. Q. Post dispersal survivorship of north Queensland rainforest seeds and fruits: Effects of forest, habitat and species.Australian Journal of Ecology, v. 19, p. 52-64, 1994.

PAQUETTE, A. et al. A million and more trees for science.Nature Ecology and Evolution, v. 2, n. 5, p. 763-766, 2018.

PATERNO, G. B. et al. Species-specific facilitation, ontogenetic shifts and consequences for plant community succession. Journal of Vegetation Science, v. 27, n. 3, p. 606-615, 2016.

PINTO, Severino Rodrigo Ribeiro et al. Referencial teórico para a restauração e protocolo de monitoramento da restauração da Caatinga. 1. ed. Recife, PE: Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste - Cepan, 2025.

QUEIROZ, L. P. et al. Diversity and Evolution of Flowering Plants of the Caatinga Domain. In: SILVA, J. M. C.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. (ed.). Caatinga. Cham: Springer, 2017.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Disponível em: https://www.R-project.org/.

REIS, E. et al. Emergência e qualidade de mudas de Copernicia prunifera em função da embebição das sementes e sombreamento.Revista Caatinga, v. 24, n. 4, p. 43-49, 2011.

SCHOEPF, I. et al. Multiple interacting factors affect seed predation in an African savanna small mammal community.Journal of Mammalogy, v. 104, n. 3, p. 446–456, 2023.

SILVA, Augusto C.; SOUZA, Alexandre F. Aridity drives plant biogeographical sub regions in the Caatinga, the largest tropical dry forest and woodland block in South America.PLoS One, v. 13, n. 4, p. e0196130, 2018.

SILVA, E. B. et al. Current knowledge of carnauba plant (Copernicia prunifera): Current stage, trends, and future perspectives. Environments, v. 12, n. 11, p. 437, 2025.

THE TREE DIVERSITY NETWORK. Disponível em: http://treedivnet.ugent.be.

VALLEJO, V. Ramón et al. Perspectives in dryland restoration: approaches for climate change adaptation.New Forests, v. 43, n. 5, p. 561-579, 2012.

VIANI, R. et al. Animal-dispersed pioneer trees enhance the early regeneration in Atlantic Forest restoration plantations.Science, v. 13, n. 1, p. 41-46, 2015.

WILLIAMS, B. A. et al. Potencial global para regeneração natural em regiões tropicais desmatadas.Nature, v. 636, p. 131–137, 2024.

Anexos



Figura 1 - Localização do experimento BrazilDry (A) e delineamento amostral do experimento com o total de 155 parcelas com o gradiente de diversidade (B).



Tabela 1 - Lista da composição de espécies utilizadas e estabelecidas no experimento BrazilDry, totalizando 16 espécies arbóreas nativas da Caatinga.



Figura 3 - Montagem dos três quadrats de 0.5m x 0.5m presentes nas 155 parcelas do BrazilDry



Figura 4 - Efeito da diversidade de espécies arbóreas nas comunidades restauradas (X) sobre a sobrevivência das plântulas de Carnaúba (Y) após 50 dias do plantio.



Figura 5 - Efeito da capacidade de facilitação (X) nas comunidades restauradas sobre a sobrevivência das plântulas de Carnaúba (Y).



Tabela 2 - Análise estatística do efeito da facilitação, diversidade e suas interações sobre a sobrevivência das plântulas de carnaúba.



Figura 6 - Efeito da diversidade de espécies arbóreas nas comunidades restauradas (X) sobre a altura média das plântulas de Carnaúba (Y) após 50 dias do plantio.



Figura 7 - Efeito da capacidade de facilitação (X) nas comunidades restauradas sobre a altura média das plântulas de Carnaúba.



Tabela 3 - Análise estatística do efeito da facilitação, diversidade e suas interações sobre a altura média das plântulas de carnaúba.



Figura 8 - Efeito da diversidade de espécies arbóreas nas comunidades restauradas (X) sobre a biomassa foliar das plântulas de Carnaúba (Y) após 50 dias do plantio.



Figura 9 - Efeito da diversidade de espécies arbóreas (X) sobre o número de sementes predadas (Y).



Tabela 4 - Número de sementes predadas em cada nível de diversidade do Brazildry.



Tabela 5 - Análise estatística do efeito da facilitação, diversidade e suas interações sobre a predação das sementes de carnaúba.

CÓDIGO: SB0437

AUTOR: JOÃO VITOR ALMEIDA DA COSTA

COAUTOR: GUSTAVO LOVATTO MICHAELSEN

ORIENTADOR: RODRIGO JULIANI SIQUEIRA DALMOLIN

TÍTULO: Estado de Alta Plasticidade no Meduloblastoma: um Programa Maligno Proliferativo com Maior Representação na Recorrência

Resumo

O meduloblastoma (MB), tumor cerebral maligno mais frequente na população pediátrica, apresenta elevada heterogeneidade molecular e celular. Neste estudo, caracterizamos um Estado de Alta Plasticidade (HPS, do inglês High-Plasticity State) em 295.124 células malignas de 38 tumores de MB, avaliando sua identidade molecular, robustez analítica, representação na recorrência e interface candidata de superfície. Foram identificadas 35.811 células HPS, correspondendo a 12,1% do compartimento maligno; 98,36% estavam em S ou G2/M. A análise pseudobulk em nível tumoral revelou um programa amplo de replicação do DNA, checkpoint, manutenção genômica, segregação cromossômica e mitose, acompanhado de menor expressão relativa de programas de identidade neuronal. A direção principal foi preservada após controle categórico de fase celular e em análises complementares por cluster e MAST. Tumores recorrentes apresentaram maior representação de HPS, inclusive no compartimento proliferativo. A análise do surfaceoma identificou um conjunto restrito de candidatos com perfis complementares de cobertura e especificidade em nível de RNA. Em conjunto, HPS caracteriza um estado maligno fortemente associado à proliferação, molecularmente reproduzível e mais representado no meduloblastoma recorrente.

Palavras-chave: Meduloblastoma; Estado de Alta Plasticidade; recorrência tumoral.

TITLE: A High-Plasticity State Defines a Proliferative Malignant Program Preferentially Represented in Recurrent Medulloblastoma

Abstract

Medulloblastoma (MB), the most common malignant pediatric brain tumor, displays substantial molecular and cellular heterogeneity. Here, we

characterized a High-Plasticity State (HPS) across 295,124 malignant cells from 38 MB tumors, evaluating its molecular identity, analytical robustness, representation in recurrent disease, and candidate cell-surface interface. We identified 35,811 HPS cells, corresponding to 12.1% of the malignant compartment; 98.36% were assigned to S or G2/M. Tumor-level pseudobulk analysis revealed a broad program involving DNA replication, checkpoint activity, genome maintenance, chromosome segregation, and mitosis, accompanied by relatively reduced neuronal-identity programs. The major molecular direction was preserved after categorical cell-cycle phase control and across complementary within-cluster and MAST analyses. Recurrent tumors showed greater HPS representation, including within the proliferative compartment. Surfaceome analysis identified a restricted set of candidate genes with complementary RNA-level coverage and specificity profiles. Together, HPS defines a proliferation-associated malignant state with a reproducible molecular architecture and greater representation in recurrent medulloblastoma.

Keywords: Medulloblastoma; High-Plasticity State; tumor recurrence.

Introdução

O meduloblastoma (MB) é o tumor cerebral maligno mais frequente na população pediátrica e constitui uma doença molecularmente heterogênea. Sua classificação atual contempla quatro grupos principais, WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4, que diferem em alterações genômicas, programas transcricionais, características clínicas e prognóstico [1]. Estudos de larga escala demonstraram heterogeneidade adicional dentro desses grupos, particularmente nos Grupos 3 e 4, indicando que a classificação do tumor como uma unidade molecular não representa integralmente sua diversidade biológica [2,3].

A transcriptômica de célula única ampliou essa perspectiva ao permitir a investigação dos estados celulares que coexistem em um mesmo tumor. Estudos de referência mostraram que células malignas de MB podem recapitular programas associados ao desenvolvimento do cerebelo e ocupar diferentes graus de diferenciação [4,5]. Em particular, tumores dos Grupos 3 e 4 apresentam combinações variáveis de programas progenitores, proliferativos e neuronalmente diferenciados. Assim, a heterogeneidade intratumoral também pode ser compreendida como uma organização de diferentes estados transcricionais malignos.

Nesse contexto, a plasticidade celular tumoral tem sido investigada como componente potencialmente relevante da adaptação e progressão da doença. Em meduloblastoma, uma análise recente de tumores primários e recorrentes descreveu um estado de alta plasticidade celular associado a intensa atividade proliferativa e maior representação durante a progressão tumoral [6]. Entretanto, estados identificados em diferentes coortes e por estratégias analíticas distintas não devem ser considerados automaticamente equivalentes.

A caracterização desses estados apresenta desafios metodológicos. A expressão observada em uma célula resulta da combinação de programas relacionados à identidade, diferenciação, ciclo celular, estresse e outras atividades biológicas. Métodos como consensus Non-negative Matrix Factorization (cNMF) permitem decompor perfis transcriptômicos em programas gênicos parcialmente sobrepostos [7]. Além disso, quando um estado é fortemente associado à proliferação, diferenças transcricionais podem refletir a distribuição desigual das fases do ciclo celular. Tratar milhares de células do mesmo tumor como réplicas independentes também pode produzir pseudorreplicação; por isso, estratégias de pseudobulk, nas quais as contagens são agregadas por réplica biológica, são adequadas para a inferência diferencial em dados unicelulares [8].

A caracterização molecular pode ainda revelar propriedades potencialmente acessíveis experimentalmente. Embora grande parte dos programas de replicação e manutenção genômica seja intracelular, proteínas de membrana podem constituir interfaces para identificação e isolamento de subpopulações malignas. Estudos em tumores cerebrais pediátricos demonstram heterogeneidade de antígenos de superfície [9], e análises de meduloblastoma indicam remodelamento do surfaceoma durante tratamento e recorrência [10].

Neste estudo, denominamos High-Plasticity State (HPS) o estado identificado por cNMF na coorte analisada. O objetivo foi caracterizar seu programa transcricional, testar sua robustez frente à composição do ciclo celular e ao contexto transcricional, avaliar sua representação em tumores primários e recorrentes e identificar genes candidatos de superfície associados ao estado.

Metodologia

Foi realizada análise de transcriptômica de célula única utilizando dados públicos de meduloblastoma disponibilizados no Gene Expression Omnibus sob o acesso GSE253557. O conjunto compreendeu 295.124 células malignas provenientes de 38 tumores, incluindo amostras primárias e recorrentes. As análises foram restritas ao compartimento maligno previamente definido; a identidade do tumor de origem foi preservada como unidade biológica para as análises inferenciais.

A classificação do Estado de Alta Plasticidade (High-Plasticity State, HPS) foi derivada de análise prévia por consensus Non-negative Matrix Factorization (cNMF) [7]. O programa originalmente identificado como X19 corresponde ao HPS neste trabalho. As células malignas foram categorizadas como HPS ou Non-HPS, sendo este último grupo constituído pelas demais células malignas. A distribuição de HPS entre as fases do ciclo celular foi examinada a partir das anotações celulares disponíveis.

A inferência principal de expressão diferencial foi conduzida por pseudobulk em nível tumoral, evitando que células do mesmo indivíduo fossem tratadas como

réplicas biologicamente independentes [8]. As contagens brutas foram agregadas separadamente para HPS e Non-HPS em cada tumor. Foram incluídos tumores com pelo menos 50 células em cada estado, totalizando 37 tumores e 74 bibliotecas pseudobulk pareadas. A análise foi realizada no edgeR [11]. Genes de baixa expressão foram filtrados com filterByExpr, as bibliotecas foram normalizadas pelo método Trimmed Mean of M-values (TMM) e as dispersões foram estimadas de forma robusta. Modelos lineares generalizados quasi-likelihood incorporaram o tumor como fator de bloqueio e HPS como efeito de interesse. A significância foi avaliada pelo teste quasi-likelihood F. Em paralelo, TREAT foi utilizado para testar efeitos superiores a |log2FC| = 0,25. Os valores de p foram corrigidos por Benjamini-Hochberg, adotando-se FDR ≤ 0,05.

Como HPS estava fortemente concentrado no compartimento proliferativo, foi realizado um controle categórico de fase restrito às células em S ou G2/M. Foram construídas bibliotecas correspondentes às combinações de tumor, fase e estado. O modelo principal bloqueou cada combinação tumor × fase e estimou o contraste HPS versus Non-HPS dentro de estratos equivalentes. Também foram avaliados contrastes separados em S e G2/M e um modelo complementar com interação entre fase e HPS. Filtragem, normalização, estimação de dispersão e testes seguiram a estratégia do pseudobulk global.

Para reduzir a influência da composição dos clusters transcricionais, foi realizada uma análise pseudobulk dentro de clusters que continham ambos os estados. Um par tumor-cluster foi elegível quando apresentava pelo menos 20 células HPS e 20 Non-HPS, e o cluster deveria atender ao critério em pelo menos três tumores. Cinco dos 58 clusters malignos foram incluídos, correspondendo a 17 estratos tumor-cluster distribuídos por 15 tumores. O efeito de HPS foi estimado dentro de cada contexto tumor-cluster.

Como validação complementar em nível celular, foi utilizado o modelo hurdle MAST [12]. Essa etapa foi dirigida a 156 genes previamente selecionados e utilizou 19.892 células balanceadas, restritas a S/G2M. O modelo incluiu estado HPS, fase e complexidade celular; tumor e cluster foram incorporados como efeitos aleatórios. A significância foi avaliada por likelihood-ratio test e corrigida por Benjamini-Hochberg.

A interpretação funcional foi complementada por Gene Set Enrichment Analysis preranked [13], utilizando fgsea e coleções Hallmark, Reactome e Gene Ontology Biological Process. Rankings independentes foram construídos para os modelos global, controlado por fase e dentro de clusters, e a robustez funcional foi avaliada pela concordância da direção do enriquecimento.

A representação de HPS foi comparada entre 33 amostras primárias e cinco recorrentes. Foram analisadas a fração de HPS no compartimento maligno total e a fração restrita a S/G2M. O efeito foi expresso como diferença entre medianas e avaliado por bootstrap, teste de Wilcoxon e teste de permutação. A estabilidade foi examinada pela exclusão sequencial de cada amostra recorrente e pelos pares primário-recorrência disponíveis.

Para caracterizar a interface de superfície, os resultados transcriptômicos foram integrados ao Cell Surface Protein Atlas e ao in silico human surfaceome/SURFY [14,15]. Os candidatos foram priorizados segundo expressão diferencial, concordância entre modelos, detecção em HPS, especificidade relativa a Non-HPS e consistência entre tumores. Uma análise complementar realizou expressão diferencial restrita ao universo canônico do surfaceoma. Cobertura foi definida como a proporção de células HPS com o transcrito detectado; especificidade foi estimada em relação à detecção nas células Non-HPS. Essas medidas correspondem a evidência em nível de RNA e não demonstram diretamente abundância ou acessibilidade da proteína na membrana.

As análises principais foram realizadas em R 4.3.2, utilizando Seurat 5.4.0, edgeR 4.0.16, limma 3.58.1, fgsea 1.24.0 e MAST 1.28.0.

Resultados e Discussões

Foram analisadas 295.124 células malignas provenientes de 38 tumores de meduloblastoma. Destas, 35.811 foram classificadas como HPS, correspondendo a aproximadamente 12,1% do compartimento maligno. A distribuição entre as fases do ciclo celular demonstrou associação marcante com proliferação. Entre as células HPS, 98,36% estavam classificadas em S ou G2/M. A Figura 1A evidencia essa mudança na composição do ciclo celular em comparação às células Non-HPS, enquanto a Figura 1B apresenta a dimensão da coorte e a frequência global do estado.

Esse resultado estabelece uma característica central do HPS. O estado encontra-se estreitamente associado às fases em que ocorrem replicação do DNA e preparação ou execução da divisão celular. Entretanto, essa concentração também cria uma questão analítica relevante, pois uma comparação global entre HPS e Non-HPS poderia refletir, em parte, diferenças na composição do ciclo celular. Por esse motivo, a interpretação molecular foi sustentada por modelos adicionais que compararam os estados dentro do compartimento proliferativo e em contextos transcricionais comparáveis. A associação observada é compatível com descrições recentes que relacionam plasticidade celular e proliferação no meduloblastoma [6], mas a definição de HPS nesta coorte deriva de uma estrutura própria de cNMF; portanto, semelhanças funcionais não estabelecem equivalência direta entre estados identificados em diferentes estudos.

A proporção de células HPS variou entre os tumores e apresentou aumento nas amostras recorrentes. Considerando o compartimento maligno total, a recorrência esteve associada a um acréscimo de aproximadamente 8,85 pontos percentuais na fração HPS. Quando a comparação foi restrita às células em S/G2M, a diferença aumentou para aproximadamente 16,86 pontos percentuais. A Figura 2A demonstra a distribuição da fração HPS entre tumores primários e recorrentes. A manutenção do aumento dentro do compartimento

proliferativo indica que a diferença observada não se reduz à presença de uma proporção globalmente maior de células em divisão nos tumores recorrentes.

A direção do efeito permaneceu estável nas análises de exclusão sequencial das amostras recorrentes e foi concordante nos pares primário-recorrência disponíveis. Embora o número de recorrências seja menor que o de amostras primárias, essa estabilidade acrescenta suporte à associação observada. A Figura 2B mostra a distribuição da atividade relacionada ao HPS no espaço transcricional maligno. O sinal não se encontra restrito a uma única região isolada do UMAP e aparece em diferentes regiões da paisagem transcricional, característica compatível com a interpretação de HPS como um estado que pode ocorrer em diferentes contextos celulares malignos, e não como uma população definida exclusivamente por um único cluster.

A análise pseudobulk global incluiu 37 tumores com representação adequada dos dois estados e 74 bibliotecas pareadas. Após filtragem, 26.663 genes foram testados. Destes, 16.064 apresentaram FDR ≤ 0,05 e 10.052 permaneceram significativos quando o TREAT incorporou o limiar de $|\log2FC| > 0,25$. A dimensão desse resultado demonstra que a distinção entre HPS e Non-HPS envolve uma reorganização transcriptômica ampla, e não apenas um pequeno conjunto de marcadores.

A Figura 3 apresenta a distribuição dos efeitos transcriptômicos em nível tumoral e evidencia uma polaridade molecular clara. No polo aumentado em HPS, destacam-se genes relacionados à replicação do DNA, checkpoint, manutenção genômica, segregação cromossômica e mitose. Entre os exemplos representativos estão RRM2, RFC3, BRCA1, TOP2A, BUB1B, NDC80, MKI67 e AURKB. Esses genes representam diferentes componentes necessários à duplicação do material genético, monitoramento da integridade genômica, organização cromossômica e divisão celular.

No polo oposto, genes relacionados à identidade e função neuronal, incluindo NTRK2, NTRK3, CDH20, CNTN3, GRM7 e LRFN2, apresentam maior expressão relativa em células Non-HPS. Essa oposição indica que a arquitetura proliferativa do HPS é acompanhada por redução relativa de componentes associados à diferenciação neuronal. A análise funcional por GSEA reforçou a mesma organização em nível de vias. Conjuntos associados a alvos de E2F, replicação do DNA, checkpoints, segregação cromossômica, fase mitótica e reparo do DNA foram enriquecidos em HPS. Em direção oposta, programas relacionados à transmissão sináptica, canais iônicos, organização neuronal e diferenciação apresentaram associação relativa com Non-HPS. Assim, o fenótipo HPS não depende apenas da expressão de genes mitóticos isolados, mas corresponde a uma organização funcional coordenada.

A forte concentração de HPS em S/G2M tornou necessário avaliar em que medida a expressão diferencial global poderia ser explicada pela composição do ciclo celular. No modelo controlado por fase, HPS e Non-HPS foram comparados dentro de estratos equivalentes de tumor e fase, totalizando 148 pseudobulks. Foram identificados 10.853 genes com FDR ≤ 0,05. Os efeitos apresentaram elevada concordância com o pseudobulk global, com correlação

de Pearson de aproximadamente 0,981. Quando foram exigidas simultaneamente significância, magnitude mínima e manutenção da direção entre os modelos global e controlado por fase, 6.801 genes preservaram o comportamento associado ao HPS.

Genes centrais de replicação, checkpoint e mitose permaneceram aumentados, enquanto genes de identidade neuronal continuaram reduzidos. O controle de fase atenuou parte das diferenças, mas não eliminou a arquitetura molecular observada. A interpretação mais adequada é, portanto, a de um estado maligno fortemente associado à proliferação cujo programa transcricional mais amplo persiste após controle categórico da fase celular. Os resultados não demonstram independência completa entre HPS e ciclo celular.

A análise dentro de clusters forneceu um controle adicional da heterogeneidade transcricional. Cinco dos 58 clusters malignos apresentaram representação suficiente de HPS e Non-HPS em múltiplos tumores, correspondendo a 17 estratos tumor-cluster distribuídos por 15 tumores. Apesar da redução do número de amostras e do consequente menor poder estatístico, o eixo molecular central foi novamente observado. Genes relacionados à replicação, manutenção do DNA, checkpoint e mitose permaneceram associados ao HPS, enquanto programas neuronais mantiveram associação relativa ao compartimento Non-HPS. A menor cobertura dessa análise deve ser considerada em sua interpretação; ausência de significância em um contexto restrito não corresponde necessariamente à ausência de efeito biológico.

O modelo MAST acrescentou uma validação complementar em nível celular. Foram avaliados 156 genes previamente selecionados em 19.892 células balanceadas, e 102 genes preencheram os critérios estabelecidos de forte validação celular. A direção dos efeitos apresentou elevada concordância com os modelos pseudobulk. Como o painel foi definido a partir de resultados previamente identificados, essa etapa não constitui uma nova triagem genômica; sua principal contribuição consiste em demonstrar que a direção molecular central é reproduzida sob uma estrutura estatística distinta. Em conjunto, o pseudobulk por tumor permanece como base inferencial, enquanto controle de fase, comparação dentro de clusters e MAST demonstram robustez frente a diferentes fontes de heterogeneidade.

A maior parte da assinatura molecular HPS corresponde a processos intracelulares. Para investigar uma interface potencialmente acessível para identificação experimental, os resultados foram integrados a referências de surfaceoma. A Figura 4 organiza os candidatos segundo duas propriedades em nível de RNA. O eixo horizontal representa a especificidade mediana para HPS em relação às células Non-HPS. O eixo vertical representa a cobertura mediana em HPS, definida como a proporção de células HPS nas quais o respectivo transcrito foi detectado. A distribuição demonstra que maior cobertura e maior especificidade não convergem necessariamente para um único marcador.

Entre os candidatos do núcleo de superfície, ADCY3, CLEC2D e RELL1 apresentam cobertura relativamente mais ampla. ADCY3 apresentou detecção

em aproximadamente 23,9% das células HPS e especificidade de 91,7%; CLEC2D apresentou cobertura próxima de 21,0% e especificidade de 91,8%; RELL1 alcançou cobertura de aproximadamente 26,4%, embora com especificidade mais moderada, de cerca de 86,3%. Esses genes representam candidatos capazes de identificar uma fração relativamente maior do compartimento HPS.

DSG2 e SLC7A1 ocupam outra região da Figura 4. DSG2 apresentou cobertura aproximada de 5,7% e especificidade de 98,1%, enquanto SLC7A1 apresentou cobertura de cerca de 11,7% e especificidade de 94,7%. Assim, ambos reconhecem uma parcela menor de HPS, mas oferecem maior seletividade relativa às demais células malignas. Essa diferença evidencia um compromisso entre cobertura e especificidade e indica que os candidatos devem ser interpretados de forma complementar, e não como um ranking unidimensional.

Candidatos com suporte convergente entre modelos ampliam esse contínuo. CDH22 favorece maior cobertura; SLC3A2 e GPA33 apresentam perfis intermediários; TACR1, TYRO3, EMP2 e IL17RB representam subpopulações mais restritas e com elevada especificidade. Genes como GPC2, EGFR e LRP5 foram mantidos como referências dependentes do contexto ou de interesse translacional. Sua presença no painel não significa que constituam o núcleo da assinatura de superfície associada ao HPS. GPC2, por exemplo, possui relevância translacional prévia em tumores cerebrais pediátricos, mas apresenta comportamento mais dependente do contexto nas comparações deste estudo.

A organização da Figura 4 também reforça que a caracterização de um surfaceoma candidato exige mais do que expressão diferencial. Cobertura, especificidade e consistência entre tumores descrevem propriedades distintas. Um marcador de alta cobertura pode ser útil para reconhecer uma fração maior do estado, mas não necessariamente distinguir HPS com alta precisão. De maneira inversa, candidatos muito específicos podem detectar apenas subpopulações pequenas. Estratégias combinatórias podem, futuramente, explorar esses perfis complementares.

Todas as evidências do surfaceoma permanecem em nível de RNA. A detecção do transcrito não demonstra automaticamente que a proteína esteja abundantemente presente na membrana plasmática, apresente um domínio extracelular acessível ou represente uma dependência funcional da célula tumoral. A confirmação proteica, a avaliação da localização membranar, a investigação de expressão em tecidos normais e ensaios funcionais são necessárias antes de atribuir aplicabilidade experimental ou terapêutica aos candidatos.

Em conjunto, as Figuras 1 a 4 representam dimensões complementares de uma mesma organização biológica. A Figura 1 estabelece que HPS representa aproximadamente 12,1% das células malignas, mas está fortemente concentrado no compartimento proliferativo. A Figura 2 demonstra maior representação do estado em tumores recorrentes e sua distribuição ao longo do espaço transcricional maligno. A Figura 3 define uma arquitetura molecular

caracterizada por replicação do DNA, checkpoint, manutenção genômica e mitose, em oposição relativa a programas de identidade neuronal. A Figura 4 demonstra que esse programa predominantemente intracelular apresenta uma interface candidata de superfície formada por genes com diferentes combinações de cobertura e especificidade.

Esses resultados favorecem a interpretação de HPS como uma dimensão reproduzível da heterogeneidade maligna do meduloblastoma. Sua identidade está profundamente relacionada à proliferação, mas inclui uma arquitetura molecular mais ampla que permanece reconhecível após controles complementares. Sua maior representação na recorrência acrescenta relevância biológica e clínica ao fenômeno, enquanto a caracterização do surfaceoma estabelece uma rota dirigida para futura identificação experimental e investigação funcional das células classificadas nesse estado.

Conclusão

O presente estudo caracterizou um Estado de Alta Plasticidade em células malignas de meduloblastoma e demonstrou que esse estado constitui um componente reproduzível da heterogeneidade tumoral, fortemente associado à proliferação.

HPS apresenta ativação coordenada de programas relacionados à replicação do DNA, checkpoint, manutenção genômica, segregação cromossômica e mitose. Em direção oposta, células Non-HPS apresentam maior expressão relativa de programas relacionados à identidade neuronal. A manutenção dos principais efeitos após controle categórico da fase celular, comparações dentro de clusters transcricionais mistos e modelagem complementar em nível celular demonstra que a arquitetura molecular do HPS se estende além de diferenças amplas na composição das fases do ciclo celular, sem implicar independência da proliferação.

Tumores recorrentes apresentaram maior representação de HPS, inclusive quando a análise foi restrita às células proliferativas. Esse resultado associa a ocupação do estado à recorrência e fornece fundamento para estudos futuros sobre sua dinâmica durante a progressão da doença.

A análise do surfaceoma identificou um conjunto restrito de genes candidatos com perfis complementares de cobertura e especificidade em nível de RNA. Esses resultados estabelecem uma interface para futura identificação experimental de células HPS. A confirmação da expressão proteica, localização membranar e relevância funcional permanece necessária para determinar a aplicabilidade desses candidatos.

Em conjunto, os achados definem HPS como um estado maligno associado à proliferação, com arquitetura molecular robusta, maior representação no

meduloblastoma recorrente e uma interface candidata de superfície para investigação experimental futura.

Referências

1. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. Acta Neuropathologica. 2012;123:465-472. doi:10.1007/s00401-011-0922-z.

2. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, et al. Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups. Cancer Cell. 2017;31(6):737-754.e6. doi:10.1016/j.ccell.2017.05.005.

3. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. Nature. 2017;547:311-317. doi:10.1038/nature22973.

4. Hovestadt V, Smith KS, Bihannic L, et al. Resolving medulloblastoma cellular architecture by single-cell genomics. Nature. 2019;572:74-79. doi:10.1038/s41586-019-1434-6.

5. Vladoiu MC, El-Hamamy I, Donovan LK, et al. Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. Nature. 2019;572:67-73. doi:10.1038/s41586-019-1158-7.

6. Liu H, Zhang J, Wang Z, et al. High cellular plasticity state of medulloblastoma local recurrence and distant dissemination. Cell Reports Medicine. 2025;6(1):101914. doi:10.1016/j.xcrm.2024.101914.

7. Kotliar D, Veres A, Nagy MA, et al. Identifying gene expression programs of cell-type identity and cellular activity with single-cell RNA-Seq. eLife. 2019;8:e43803. doi:10.7554/eLife.43803.

8. Squair JW, Gautier M, Kathe C, et al. Confronting false discoveries in single-cell differential expression. Nature Communications. 2021;12:5692. doi:10.1038/s41467-021-25960-2.

9. Haydar D, Houke H, Chiang J, et al. Cell-surface antigen profiling of pediatric brain tumors: B7-H3 is consistently expressed and can be targeted via local or systemic CAR T-cell delivery. Neuro-Oncology. 2021;23(6):999-1011. doi:10.1093/neuonc/noaa278.

10. Bakhshinyan D, Suk Y, Kuhlmann L, et al. Dynamic profiling of medulloblastoma surfaceome. Acta Neuropathologica Communications. 2023;11:111. doi:10.1186/s40478-023-01609-7.

11. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010;26(1):139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.

12. Finak G, McDavid A, Yajima M, et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. Genome Biology. 2015;16:278. doi:10.1186/s13059-015-0844-5.

13. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102.

14. Bausch-Fluck D, Hofmann A, Bock T, et al. A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas. PLoS ONE. 2015;10(4):e0121314. doi:10.1371/journal.pone.0121314.

15. Bausch-Fluck D, Goldmann U, Müller S, et al. The in silico human surfaceome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018;115(46):E10988-E10997. doi:10.1073/pnas.1808790115.

Anexos



Figura 1. Caracterização do HPS e visão geral da coorte



Figura 2. Representação do HPS em tumores primários e recorrentes e distribuição no espaço transcricional maligno



Figura 3. Programa transcricional associado ao HPS por pseudobulk tumoral



Figura 4. Surfaceoma candidato associado ao HPS segundo cobertura e especificidade em nível de RNA

CÓDIGO: SB0438

AUTOR: JANINE JOSINO DE MEDEIROS

ORIENTADOR: MANUELA SALES LIMA NASCIMENTO

TÍTULO: Perfil Imunológico de recém-nascidos expostos à toxoplasmose materna.

Resumo

O Toxoplasma gondii (T. gondii) causa uma infecção geralmente assintomática, mas de grande relevância na gestação devido ao risco de transmissão vertical e desenvolvimento de toxoplasmose congênita, com possíveis repercussões fetais graves. Este estudo investigou parâmetros hematológicos, imunológicos e bioquímicos em recém-nascidos expostos à toxoplasmose materna. Trata-se de um estudo observacional, exploratório e por conveniência, com 9 recém-nascidos distribuídos nos grupos controle (CT; n=5) e toxoplasmose exposto (TE; n=4). Dados clínicos e laboratoriais foram coletados para caracterização dos grupos. No perfil hematológico, foram avaliados 10 parâmetros, incluindo série vermelha, série branca e plaquetas, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A proteína C-reativa (PCR) foi analisada de forma descritiva no grupo TE, sem valores acima da referência adotada. No perfil imunológico, foram avaliados 21 marcadores, dos quais IL-12p70, IL-10, IL-7 e MIP-3α/CCL20 apresentaram menores concentrações no grupo TE em relação ao CT ($p<0,05$). Os achados sugerem que a exposição à toxoplasmose materna pode estar associada a alterações no perfil imunológico neonatal, enquanto não foram detectadas alterações nos parâmetros hematológicos avaliados ou elevação da PCR. O pequeno tamanho amostral limita a interpretação dos resultados e reforça a necessidade de estudos com grupos maiores e mais representativos.

Palavras-chave: Exposição a toxoplasmose; Mediadores imunológicos; Hematologia.

TITLE: Immune Profile of Newborns Exposed to Maternal Toxoplasmosis

Abstract

Toxoplasma gondii (T. gondii) causes an often asymptomatic infection that is highly relevant during pregnancy due to the risk of vertical transmission and the development of congenital toxoplasmosis, with potentially severe fetal outcomes. This study investigated hematological, immunological, and biochemical parameters in newborns exposed to maternal toxoplasmosis. This was an observational, exploratory, convenience-based study including 9 newborns divided into a control group (CT; n=5)

and a toxoplasmosis-exposed group (TE; n=4). Clinical and laboratory data were collected for group characterization. Ten hematological parameters, including red blood cell, white blood cell, and platelet parameters, were evaluated, with no statistically significant differences between groups. C-reactive protein (CRP) was descriptively assessed in the TE group, with no values above the adopted reference range. Among 21 immunological markers, IL-12p70, IL-10, IL-7, and MIP-3α/CCL20 showed lower concentrations in the TE group than in controls ($p<0.05$). These findings suggest that maternal exposure to toxoplasmosis may be associated with alterations in the neonatal immunological profile, while no hematological changes or CRP elevations were detected. The small sample size limits interpretation and reinforces the need for studies with larger and more representative groups.

Keywords: Toxoplasmosis; Newborn; Cytokines; Chemokines; Neonatal immunity

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii (T. gondii)*, amplamente distribuída no mundo e capaz de infectar diferentes espécies de animais, incluindo o ser humano. A infecção ocorre principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados com o parasito, além do consumo de carnes cruas ou mal cozidas contendo cistos teciduais. Embora grande parte das infecções em indivíduos imunocompetentes seja assintomática, a toxoplasmose apresenta maior importância clínica em indivíduos imunossuprimidos e durante a gestação (BRASIL, 2018; DUBEY et al., 2012).

Quando a infecção ocorre durante a gestação, o parasito pode atravessar a placenta e infectar o feto, resultando em toxoplasmose congênita. O risco de transmissão vertical aumenta com o avanço da idade gestacional, enquanto as consequências para o feto tendem a ser mais graves quando a infecção ocorre nas fases iniciais da gestação (BRASIL, 2022). A toxoplasmose congênita pode estar associada a alterações neurológicas e oculares, além de perdas gestacionais, e representa um importante problema de saúde em diferentes regiões do mundo. Uma revisão sistemática publicada no Bulletin of the World Health Organization identificou cargas particularmente elevadas da doença na América do Sul (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013).

No Brasil, a importância da infecção é ainda maior devido à elevada circulação de *T. gondii* na população. O país possui elevada prevalência da infecção e existe um importante impacto da toxoplasmose congênita em crianças brasileiras (DUBEY et al., 2012). Além disso, muitos casos de infecção materna e congênita podem não apresentar manifestações clínicas evidentes inicialmente, reforçando a importância do acompanhamento durante o pré-natal e no período neonatal.

A gestação também representa um período de intensa interação imunológica entre mãe, placenta e feto. O sistema imune materno não se encontra simplesmente suprimido durante esse período, mas passa por mudanças que permitem manter a tolerância ao feto e, ao mesmo tempo, responder a possíveis agentes infecciosos. A placenta participa ativamente dessa interação, funcionando não apenas como uma barreira física, mas

também como um tecido imunologicamente ativo, capaz de responder à presença de microrganismos e modificar o ambiente materno-fetal (MOR; CARDENAS, 2010; YOCKEY; IWASAKI, 2018).

Nesse contexto, uma infecção materna pode influenciar o desenvolvimento imunológico fetal mesmo quando não ocorre transmissão do agente para o feto. Estudos sobre diferentes infecções maternas mostram que a exposição intrauterina pode estar associada a alterações nas respostas imunes observadas após o nascimento, incluindo modificações em citocinas e em populações celulares (DAUBY; FLAMAND, 2022). No caso de *T. gondii*, estudos com células placentárias humanas também demonstram que o contato com o parasito induz respostas imunológicas na placenta, com aumento da expressão de genes relacionados à imunidade e produção de quimiocinas, reforçando que a exposição materna ao parasito pode gerar alterações na interface materno-fetal mesmo antes de se considerar a ocorrência de infecção congênita (ANDER et al., 2018).

Motivado por esse contexto apresentado, o presente trabalho buscou investigar possíveis repercussões da exposição à toxoplasmose materna sobre algumas características de recém-nascidos nos primeiros dias de vida. Para isso, foram comparados parâmetros hematológicos e concentrações séricas de citocinas e quimiocinas entre recém-nascidos divididos em grupos de bebês expostos e de controles, buscando identificar possíveis alterações associadas à exposição intrauterina, mesmo na ausência de confirmação de infecção congênita.

Metodologia

i. Sujeitos do estudo e aspectos éticos

O estudo foi do tipo observacional e exploratório, obedecendo às diretrizes da Resolução nº 466/2012 - Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, e esteve de acordo com as normas da experimentação humana do Ministério da Saúde do Brasil e da Declaração de Helsinque. O recrutamento de pacientes foi realizado na Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), instituição que já havia concedido anuência para realização do projeto (Protocolo Nº 12821). O projeto no qual este plano está vinculado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP), sob o CAAE nº 85291824.5.0000.5537.

O estudo foi inicialmente concebido para avaliar recém-nascidos com toxoplasmose congênita; entretanto, diante da baixa disponibilidade de casos confirmados durante o período de execução do projeto, a casuística obtida foi composta por recém-nascidos com exposição materna documentada ou registrada à infecção por T. gondii. A partir dessa casuística, foram avaliados parâmetros hematológicos e o perfil sérico de citocinas e quimiocinas, em comparação com recém-nascidos controles.

As gestantes internadas foram convidadas para participar do estudo e, após esclarecimento sobre os procedimentos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para compor o grupo estudado, foram incluídas gestantes que apresentaram registro de resultado reagente para IgM de toxoplasmose em algum momento da gravidez ou relato clínico de infecção presente em prontuários, sendo os respectivos recém-nascidos considerados expostos à infecção materna por T. gondii.

Os recém-nascidos dessas mães participantes da pesquisa foram distribuídos em dois grupos: o grupo controle (CT), composto por 5 crianças cujas mães não apresentaram registro de resultados reagentes para toxoplasmose durante a gestação, além de não apresentarem registro de infecções maternas com potencial de transmissão vertical e associação com infecções congênitas; e o grupo toxoplasmose exposto (TE), contendo 4 crianças cujas mães possuíam registro de infecção ou exposição ao T. gondii durante a gestação atual. Do grupo controle foram utilizados subconjuntos de quatro controles em cada análise, de acordo com disponibilidade de amostras e resultados laboratoriais.

Após a obtenção dos TCLEs assinados, prontuários maternos foram revisados para coletar dados sobre a mãe, como idade materna, idade gestacional, comorbidades, métodos de tratamento para as comorbidades estudadas, quando aplicável, registros de infecção por T. gondii, resultados de IgM e IgG para toxoplasmose, exames prévios de biomarcadores inflamatórios, exames bioquímicos e de avaliação de função renal e hepática, quando disponíveis.

Os prontuários dos recém-nascidos também foram coletados para análise de informações como idade gestacional ao nascimento, peso ao nascer, comprimento, perímetro cefálico, Apgar, sexo, via de parto, adequação do peso para idade gestacional (PIG/AIG/GIG), hipoglicemia neonatal, necessidade de UTI neonatal, desconforto respiratório, icterícia e intercorrências neonatais registradas. Os exames bioquímicos referentes aos recém nascidos foram investigados, mas devido à ausência de padronização na solicitação desses exames durante a assistência clínica, foram considerados apenas os resultados disponíveis nos prontuários.

ii. Coleta de sangue e hemograma

O sangue dos recém-nascidos foi coletado até o segundo dia de vida, antes da administração das primeiras vacinas. No momento da coleta, nenhum dos recém-nascidos dos grupos TE e CT havia recebido as vacinas BCG ou hepatite B. O material utilizado consistiu em seringa estéril e descartável e a coleta tinha como objetivo adquirir cerca de 1 mL de sangue por punção venosa, sendo utilizado tubo de EDTA (~500 uL) e tubo sem anticoagulante contendo gel separador (~500 uL). Os tubos de sangue total foram encaminhados para um hemograma automatizado, para contabilização de eritrograma, leucograma e plaquetograma.

O soro das amostras coletadas em tubo sem anticoagulante foram armazenadas congeladas a -80oC para posterior utilização para quantificação de citocinas e quimiocinas pela técnica de Luminex.

iii. Quantificação de citocinas e quimiocinas séricas

As citocinas e quimiocinas foram quantificadas utilizando a amostra de soro da coleta realizada até 2 dias após o nascimento e devidamente conservadas até o momento da análise, como já descrito. As concentrações de citocinas e quimiocinas escolhidas seguem o painel MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (MilliporeSigma, Burlington, MA, EUA). A aquisição dos dados ocorreu por meio de equipamento Luminex 200, utilizando o software xPONENT®, que permite a quantificação simultânea de múltiplos mediadores imunológicos, incluindo as citocinas TNFα, IL-1β, IL-6, IL-2, IL-12 (p70), IFNγ, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-23 e IL-10, os fatores de crescimento , IL-7 e GM-CSF/CSF2 e as quimiocinas séricas IL-8/CXCL8, I-TAC/CXCL11, Fractalkine/CX3CL1, MIP-1α/CCL3, MIP-1β/CCL4 e MIP-3α/CCL20.

iv. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software). As comparações entre os recém-nascidos expostos à toxoplasmose materna (TE) e o grupo controle (CT) foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann–Whitney, bicaudal, considerando a independência entre os grupos e o reduzido tamanho amostral. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média (EPM), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. A proteína C-reativa (PCR) foi avaliada apenas de forma descritiva no grupo exposto, devido à disponibilidade limitada de resultados no grupo controle.

Resultados e Discussões

1. Caracterização materna e neonatal

Nessa pesquisa foram avaliados prontuários de mães que deram entrada na Maternidade Escola Januário Cicco. Para compor o grupo exposto (TE), foram consideradas gestantes que apresentavam registro de toxoplasmose em prontuário ou resultados laboratoriais compatíveis com infecção durante a gestação. Esse critério foi adotado porque muitas gestantes chegam à maternidade encaminhadas de outros serviços, não sendo possível ter acesso a todos os dados referentes ao acompanhamento pré-natal. A partir dos prontuários disponíveis, também foram levantadas informações como idade materna, idade gestacional e comorbidades, que auxiliaram na seleção de controles sem evidência de toxoplasmose e com características maternas semelhantes às do grupo exposto, buscando reduzir a influência de outras condições sobre os resultados avaliados (Tabela 1).

Em relação aos recém-nascidos, foram avaliadas características clínicas e laboratoriais obtidas nos primeiros dias de vida, incluindo idade gestacional ao nascimento, classificação quanto à adequação do peso para a idade gestacional e apgar (Aparência, Pulso, Gestos/irritabilidade, Atividade, Respiração), no qual os RNs de ambos os grupos obtiveram resultados variando entre 8/9 e 9/9. Como resultados entre 7 e 9 no teste são considerados bons, esses valores indicam boas condições de nascimento e boa adaptação ao ambiente extrauterino. Além disso, nos prontuários foram investigadas intercorrências neonatais e resultados sorológicos para toxoplasmose, quando

disponíveis (Tabela 2). Os recém nascidos do grupo controle não são testados para toxoplasmose ao nascer já que as mães não positivaram para a infecção durante a gestação, dispensando a necessidade desses testes para investigar transmissão vertical.

Por outro lado, para recém-nascidos do grupo TE a interpretação da relação infecção materna/fetal funciona diferente. Apesar de os casos com sorologia disponível apresentarem IgM anti-*T. gondii* não reagente, esse resultado isoladamente não permite excluir toxoplasmose congênita. Segundo o Ministério da Saúde, a ausência de IgM ou IgA específicas no recém-nascido não descarta a infecção congênita, enquanto a presença de IgG pode refletir transferência transplacentária de anticorpos maternos (BRASIL, 2018) e também não confirma a infecção. Por isso, a confirmação ou exclusão diagnóstica pode depender do acompanhamento sorológico ao longo dos primeiros meses de vida, e por isso o grupo estudado é considerado apenas como exposto.

2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

A avaliação dos parâmetros hematológicos não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos TE e CT. Para os parâmetros do eritrograma a contagem de eritrócitos hemoglobina e do hematócrito não apresentou diferença significativa (Figura 1 A-C). Em relação ao leucograma, a média das contagens de leucócitos, neutrófilos linfócitos, eosinófilos basófilos e monócitos (Figura 1 D–I) também não apresentou diferença do grupo de TE em relação ao grupo CT. A média da contagem de plaquetas (Figura 1 J) também não apresentou diferença entre os grupos analisados. Apesar disso, a ausência de significância estatística não significa necessariamente que os dois grupos apresentem perfis hematológicos equivalentes. O número reduzido de participantes, com apenas quatro recém-nascidos no grupo TE e quatro no controle, diminui a capacidade do estudo de identificar diferenças de menor magnitude, sendo mais adequado afirmar que, no contexto avaliado, não foram detectadas alterações hematológicas associadas à exposição materna à toxoplasmose.

A interpretação dos parâmetros hematológicos nesses grupos também deve considerar as mudanças fisiológicas que ocorrem durante a adaptação pós-natal. Um estudo que avaliou recém-nascidos nos primeiros quatro dias de vida observou que alguns parâmetros sofreram modificações ao longo desse período, como redução de leucócitos e neutrófilos, enquanto eritrócitos e plaquetas permaneceram relativamente estáveis (MELIOLI et al., 2011). Como as coletas do presente estudo ocorreram até o segundo dia de vida, possíveis diferenças no momento exato da coleta entre os participantes podem ter introduzido variabilidade fisiológica nos parâmetros hematológicos, especialmente no leucograma, sendo isso algo que deve ser considerado na interpretação da ausência de diferenças entre os grupos.

Por outro lado, alterações hematológicas já foram descritas em crianças com toxoplasmose congênita confirmada. Machado et al. (2014) observaram leucocitose acompanhada por aumento das contagens de monócitos e linfócitos em lactentes infectados, principalmente entre aqueles que apresentavam lesões retinocoroidites ativas. No entanto, o estudo avaliou uma população bastante diferente da presente pesquisa, composta por lactentes com aproximadamente 45 dias de vida e diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita. Essas diferenças quanto à idade e ao status de

infecção podem contribuir para a ausência, no presente estudo, do perfil hematológico observado pelos autores.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, a proteína C-reativa (PCR) foi o único marcador disponível para todos os recém-nascidos do grupo TE, apresentando valores entre 0,6 e 3,2 mg/L (Tabela 3), todos dentro do valor de referência de < 6, 0 mg/L . Devido à ausência desse exame em grande parte do grupo controle, esses resultados foram avaliados apenas de forma descritiva. Além disso, a interpretação da PCR nos primeiros dias de vida deve ser realizada com cautela, já que suas concentrações podem variar mesmo em recém-nascidos saudáveis. Um estudo de 2018 demonstrou o aumento progressivo da PCR entre 12 e 48 horas após o nascimento e observou influência de fatores perinatais, incluindo a via de parto (PERRONE et al., 2018), fator não padronizado entre os nossos pacientes recrutados. Dessa forma, os valores observados no grupo TE foram aqui utilizados apenas como parte da caracterização laboratorial, sem que fosse possível associá-los especificamente à exposição materna por *T. gondii.*

3. Citocinas e quimiocinas

A análise por Luminex permitiu avaliar simultaneamente 13 citocinas, 2 fatores de crescimento e 6 quimiocinas séricas nos grupos TE e CT. As citocinas inatas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 (Figura 2 A–C) não apresentaram diferença significativa entre os grupos, assim como a citocina linfoproliferativa IL-2 (Figura 2 D). Entre as citocinas relacionadas ao perfil Th1, a inata IL-12p70 (Figura 2 E) demonstrou diferença na concentração, apresentando diminuição no grupo TE em relação ao grupo CT ($p = 0.0265$), já a IFN-γ (Figura 2 F) não apresentou diferença significativa. Também não foram observadas diferenças nas citocinas que estão relacionadas ao perfil de linfócitos Th2, a IL-4, IL-5 e IL-13 (Figura 2 G–I), assim como nas relacionadas principalmente ao perfil Th17 de linfócitos, com a IL-17A, IL-21 e IL-23 (Figura 2 J–L). Por outro lado, a citocina regulatória IL-10 (Figura 2 M), apresentou uma significativa média menor no grupo TE em relação ao CT ($p = 0,0286$), assim como o fator de crescimento e sobrevivência de linfócitos, IL-7 (Figura 2 N), apresentou diminuição no grupo TE em relação ao CT ($p = 0.0294$). Enquanto que a a CSF2 (Figura 2 O), responsável pela proliferação de neutrófilos, não apresentou diferença entre os grupos ($p = 0.2286$).

As quimiocinas analisadas apresentaram diferença nas médias geralmente com o grupo TE apresentando quantidades menores que o grupo CT, mas apenas uma apresentou diferença significativa. As quimiocinas CXCL8, CXCL11, CX3CL1, CCL3 e CCL4 (Figura 3 A–E) comumente estimuladas por TNF-α e IL-1β e com funções similares de quimiotaxia das células imunes, não apresentaram diferença significativa entre os grupos . A quimiocina CCL20 (Figura 3 F), geralmente associada a quimiotaxia de linfócitos auxiliares, apresentou diferença significativa, com apresentação de menor concentração dessa quimiocina no grupo TE em relação ao grupo CT.

Entre os mediadores que apresentaram diferenças significativas entre os grupos, IL-12p70 e IL-10 já foram avaliadas em estudos com lactentes com toxoplasmose congênita confirmada. Uma pesquisa brasileira realizada em Minas Gerais analisou amostras coletadas entre 30 e 45 dias de vida, e observou que tanto IL-12p70 quanto IL-10 séricas apresentaram baixa capacidade de diferenciar crianças infectadas dos controles (ARAÚJO et al., 2020). Esse resultado indica que a concentração sérica

isolada dessas citocinas pode não representar de forma direta a resposta imunológica relacionada à infecção por *T. gondii.* No presente estudo, os dois marcadores apresentaram menores médias no grupo TE, mas é importante considerar que foram avaliados recém-nascidos apenas expostos à toxoplasmose materna e em um período muito mais precoce após o nascimento, o que dificulta uma comparação direta entre os estudos.

Para IL-7, os estudos disponíveis sobre sua participação na resposta ao *T. gondii* são principalmente experimentais. Bhadra et al. (2010), em modelo murino, observaram que a ausência isolada de IL-7 apresentou pouco efeito sobre a resposta de células T CD8+, enquanto a ausência conjunta de IL-7 e IL-15 comprometeu a produção de IFN-γ, a atividade citotóxica e a resposta ao parasito. Dessa forma, apesar da menor concentração de IL-7 observada no grupo TE, ainda não é possível relacionar esse achado diretamente a uma alteração funcional da resposta imune dos recém-nascidos.

A MIP-3α/CCL20 também já foi relacionada à resposta ao *T. gondii* durante a gestação. Ander et al. (2018) observaram aumento da expressão de CCL20 em trofoblastos humanos infectados pelo parasito, indicando a participação dessa quimiocina na resposta da interface materno-fetal à infecção. Entretanto, esse estudo avaliou expressão gênica em células placentárias, enquanto no presente trabalho foram avaliadas concentrações séricas nos recém-nascidos. Por isso, também não é possível estabelecer uma relação direta entre a resposta placentária observada pelos autores e a menor concentração de CCL20 encontrada no grupo TE.

Conclusão

O presente estudo avaliou parâmetros hematológicos e o perfil sérico de citocinas e quimiocinas em recém-nascidos expostos à toxoplasmose materna nos primeiros dias de vida, comparando-os a recém-nascidos controles. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros hematológicos avaliados entre os grupos, enquanto os dados de PCR foram utilizados apenas de forma descritiva devido à ausência de resultados disponíveis de maneira sistemática no grupo controle.

Na avaliação do perfil imunológico, dos 21 marcadores testados, 4 apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo controle, e as diferenças observadas não se concentraram em um único eixo da resposta imune. Entre os mediadores associados ao perfil Th1, a IL-12p70 apresentou menor concentração no grupo TE, enquanto os mediadores relacionados aos perfis Th2 e Th17 não apresentaram diferenças entre os grupos. Além disso, também foram observadas menores concentrações de IL-10, IL-7 e MIP-3α/CCL20, demonstrando que pode haver alterações em mediadores relacionados à regulação da resposta imune, à manutenção de populações linfocitárias e à quimiotaxia celular.

O reduzido tamanho amostral e a ausência de confirmação de toxoplasmose congênita nos recém-nascidos expostos representam limitações importantes do estudo. Ainda assim, a avaliação realizada nos primeiros dias de vida contribui para a investigação das possíveis repercussões da exposição à toxoplasmose materna. Estudos com maior

número de participantes e acompanhamento longitudinal dos recém-nascidos poderão ajudar a esclarecer se as diferenças observadas representam alterações consistentes relacionadas à exposição materna ou à infecção congênita.

Referências

ANDER, S. E. et al. Human placental syncytiotrophoblasts restrict Toxoplasma gondii attachment and replication and respond to infection by producing immunomodulatory chemokines. mBio, v. 9, n. 1, e01678-17, 2018. DOI: 10.1128/mBio.01678-17.

ARAÚJO, T. E. de et al. Putative biomarkers for early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis. Scientific Reports, v. 10, n. 1, art. 16757, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-73265-z.

BHADRA, R.; GUAN, H.; KHAN, I. A. Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8+ T cell response against Toxoplasma gondii. PLoS ONE, v. 5, n. 5, e10842, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0010842.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de gestação de alto risco. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de notificação e investigação: toxoplasmose gestacional e congênita. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018.

DAUBY, N.; FLAMAND, V. From maternal breath to infant's cells: impact of maternal respiratory infections on infants' immune responses. Frontiers in Pediatrics, v. 10, art. 1046100, 2022. DOI: 10.3389/fped.2022.1046100.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012. DOI: 10.1017/S0031182012000765.

MACHADO, A. S. et al. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. Mediators of Inflammation, v. 2014, art. 910621, 2014. DOI: 10.1155/2014/910621.

MELIOLI, G. et al. Reference values of blood cell counts in the first days of life. Frontiers in Bioscience (Elite Edition), v. 3, n. 3, p. 871-878, 2011. DOI: 10.2741/E295.

MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. American Journal of Reproductive Immunology, v. 63, n. 6, p. 425-433, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x.

PERRONE, S. et al. C reactive protein in healthy term newborns during the first 48 hours of life. Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition, v. 103, n. 2, p. F163-F166, 2018. DOI: 10.1136/archdischild-2016-312506.

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bulletin of the World Health Organization, v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013. DOI: 10.2471/BLT.12.111732.

YOCKEY, L. J.; IWASAKI, A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. Immunity, v. 49, n. 3, p. 397-412, 2018. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.07.017.

Anexos



Figura 1. Parâmetros hematológicos



Figura 2. Citocinas e fatores



Figura 3. Quimiocinas



Tabela 1 - Características maternas dos grupos controle e exposto



Tabela 2 - Características dos recém-nascidos dos grupos controle e exposto



Tabela 3 - Dosagens de PCR no grupo TE.

CÓDIGO: SB0454

AUTOR: BIANCA MARIA RODRIGUES DE MORAIS

ORIENTADOR: SERGIO ADRIANE BEZERRA DE MOURA

TÍTULO: Coleta e processamento laboratorial de citologia esfoliativa da mucosa bucal

Resumo

O uso de cigarro eletrônico tem apresentado notável prevalência no Brasil, associado a potenciais alterações na cavidade oral, especialmente na mucosa bucal .Contudo, esses dispositivos eletrônicos são negligenciados por uma falsa ideia de inofensividade. Este projeto propõe um estudo clínico, transversal e comparativo, com voluntários pareados por idade e sexo. Foram obtidos tanto dados sociodemográficos, hábitos parafuncionais e hábitos de fumar por meio de formulário; quanto coleta das amostras das células da mucosa bucal de cada voluntário, onde foi usado o método de citologia esfoliativa. Posteriormente, foi feito uma análise morfométrica para mensurar a normalidade através da área nuclear e do citoplasma e a relação núcleo/citoplasma das células da mucosa bucal de cada voluntário. Desse modo, a pesquisa visa contribuir para a elucidação dos reais impactos dos dispositivos eletrônicos de fumar, promovendo uma abordagem mais aprofundada.

Palavras-chave: Cigarro Eletrônico; Citologia Esfoliativa; Morfometria.

TITLE: Collection and Laboratory Processing of Exfoliative Cytology of the Buccal Mucosa

Abstract

The use of electronic cigarettes has presented notable prevalence in Brazil, associated with potential changes in the oral cavity, especially in the buccal mucosa. Nevertheless, these electronic devices are neglected by a false idea of harmlessness. This project proposes a clinical, cross-sectional, and comparative study with volunteers matched by age and sex. There were obtained both sociodemographic data, parafunctional habits, and smoking habits through a form, as well as the collection of the samples of the buccal mucosa cells of each volunteer, where was used the method of exfoliative cytology. Later, was done a morphometric analysis to measure the normality through the nuclear area and

of the cytoplasm and the nucleus/cytoplasm relation of the cells of the buccal mucosa of each volunteer. In this way, the research aims to contribute to the elucidation of the real impacts of the electronic smoking devices, promoting an approach more deepened.

Keywords: Electronic cigarette; Exfoliative Cytology; Morphometry.

Introdução

Os dispositivos eletrônicos para fumar (DEFs), incluindo cigarros eletrônicos (e-cigarro, dispositivo vaping), são produtos a bateria e usados para inalação de um aerossol, que normalmente contém nicotina, flavorizantes e outros produtos químicos. Sua aparência é similar à de cigarros tradicionais, charutos ou cachimbos e os mais modernos assemelham a canetas ou pen drives (NIDA, 2020). O e-cigarro contém um cartucho recarregável, preenchido com um líquido composto de propilenoglicol, nicotina, substâncias aromatizantes. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proíbe a comercialização, importação e propaganda de quaisquer dispositivos eletrônicos para fumar, como medida de precaução e proteção à saúde da população (BARUFALDI et al, 2021).

Um dos primeiros protótipos do DEFs surgiu em de 2003, desenvolvido pelo farmacêutico chinês Hon Lik, com um dispositivo com nicotina e sem fumaça. Dessa forma, o mesmo acreditava que o protótipo sem fumaça não produziria as substâncias tóxicas presentes no cigarro convencional (WALLACE, FORONJY, 2019).Os primeiros dispositivos, chamados de “cigalikes“, surgiram na Europa e Estados Unidos entre 2007 e 2010. Posteriormente, de 2010 a 2013, surgiu a segunda geração e grandes marcas começaram a se popularizar, as chamadas canetas de vape recarregáveis (PARK; CROTTY ALEXANDER; CHRISTIANI, 2022).

Os cigarros eletrônicos são a forma de nicotina mais usada entre os jovens nos Estados Unidos. Muitos deles nem percebem que os dispositivos vaping contêm nicotina, considerando apenas aromatizantes nos cartuchos. A fácil disponibilidade, anúncios atrativos, vários sabores de e-líquidos e a crença de que são mais seguros do que os cigarros ajudaram a torná-los atraentes para essa faixa etária. Além disso, eles são fáceis de esconder dos responsáveis por não apresentarem odor de tabaco e alguns são disfarçados de pen drives (NIDA, 2020).

A ideia inicial do cigarro eletrônico ser uma alternativa menos agressiva não se concretizou e há evidências do surgimento de semelhantes àquelas provocadas pelo uso de cigarro convencional, além de considerar o amplo espectro de substâncias tóxicas na sua composição (GALLAGHER, et al, 2023).

O tabagismo é responsável por considerável morbidade e mortalidade, com metade de todos os fumantes morrendo de uma doença relacionada ao tabagismo, como câncer ou doenças vasculo-respiratórias (Doll et al. 2004) e é um importante fator de risco para doenças bucais, como câncer e periodontite (US SURGEON GENERAL, 2014). Estudos de toxicologia identificaram diversos componentes presentes no aerossol de cigarro eletrônico que são danosos à saúde, incluindo nanopartículas, compostos orgânicos voláteis, carbonilas, metais pesados e nicotina (Wang et al. 2019).

Além disso, em razão da dependência da nicotina, substância que se liga aos receptores nicotínicos dos neurônios dopaminérgicos encefálicos, que liberam dopamina dando uma sensação de relaxamento, prazer e, à longo prazo, adicção (FRANCO, et al, 2024). Apesar do amplo espectro de substâncias tóxicas presentes na proposta terapêutica, ainda há algumas patologias não mensuradas ao uso do DEFs. Nesse contexto, insere-se a presente pesquisa, cujo tema aborda o uso de dispositivos eletrônicos para fumar e os impactos na citomorfometria de células da mucosa bucal. Assim, o estudo justifica-se pela necessidade de comprovar os malefícios e os danos celulares, através da avaliação das alterações microscópicas, onde busca-se gerar evidências sobre a toxicidade local provocada pelo contato uso dos dispositivos, desmistificando a ideia de inofensividade do produto e fornecendo embasamento científico sólido sobre os reais riscos à saúde bucal.

Neste estudo, foi analisado o impacto do uso de cigarros eletrônicos nas células epiteliais que descamam da mucosa oral. Será utilizado o método da citologia esfoliativa convencional e a análise morfométrica do núcleo e citoplasma das células.

Metodologia

OBJETIVOS

Avaliar o efeito do uso de dispositivos eletrônicos para fumar na morfologia/morfometria de células epiteliais da mucosa bucal.

METODOLOGIA

Esse estudo foi desenvolvido após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, com número do parecer 6.479.877. A amostra foi composta por 70 voluntários, sendo 35 usuários de cigarro eletrônico (Grupo Estudo - GE), pareados em sexo e idade com voluntários não fumantes (Grupo Controle - GC). Foi utilizado um formulário de coleta de dados sociodemográficos, hábitos de fumar, hábitos parafuncionais (ex. bruxismo, apertamento dental) e hábitos de higiene bucal. A seguir, foi realizada a coleta de células descamadas da mucosa jugal (direita e esquerda) utilizando a técnica de citologia esfoliativa com uso de escova Kolpast®. A escova foi pressionada levemente sobre a mucosa e realizado 3 giros em sentido horário, dispondo o material sobre lâmina de vidro devidamente identificado (grupo e lado da coleta). Imediatamente após a coleta, o esfregaço foi fixado com spray fixador celular Kolpofix® com 3 jatos a 15cm de distância da lâmina. A seguir, as lâminas foram coradas seguindo

a técnica de Papanicolaou, de acordo com o protocolo convencional de Papanicolau e Traut (1941). Na execução da técnica, as lâminas foram hidratadas com banhos em concentrações decrescentes de álcoois (95%, 80%, 70% e 50%) até a água destilada. As lâminas foram coradas pela hematoxilina, seguidas de lavagem em água corrente. Após a etapa de coloração nuclear, efetuou-se a coloração citoplasmática com Orange G (OG-6) e, posteriormente, com EA (Eosina-Azul de luz/Verde claro), permitindo diferenciação celular e avaliação morfológica. Ao término da coloração, as lâminas foram desidratadas em álcoois em concentrações crescentes (50%, 70%, 80% e 95%), diafanizadas em xilol e montadas com lamínula utilizando meio de montagem sintético Entellan.

Foram obtidas fotomicrografias das lâminas citológicas utilizando o sistema de captura (Pro-View, OPTIKA, Italy) acoplado ao microscópio óptico, em ampliação 400X. A seguir, foram realizadas medidas das áreas de núcleo e citoplasma de 50 células de cada participante da pesquisa utilizando o software Image J, seguindo metodologia empregada por Ogden et al. (1990). Os dados foram registrados em planilha Excel e obtida a relação núcleo/citoplasma.

A avaliação morfológica dos esfregaços citológicos seguiu o protocolo apresentado na classificação de Papanicolaou e Traut (1941). De acordo com Folsom et al (1972), o Federal Health Programs Service (EUA) classifica o material citológico conforme segue:

Classe I: Ausência de células atípicas ou anormais; citologia normal;

Classe II: Alterações celulares benignas/inflamatórias, sem evidência de malignidade;

Classe III: Citologia suspeita; presença de células atípicas sugestivas, mas não conclusivas, de malignidade;

Classe IV: Fortemente sugestiva de malignidade;

Classe V: Citologia conclusiva para malignidade

Análise estatística:

Os dados clínicos, morfológicos e morfométricos foram registrados em planilhas eletrônicas Excel (Microsoft Office 2021®) e transferidos para o software Statistical Package for the Social Sciences 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para análise estatística descritiva e inferencial.

Os dados morfométricos foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e de homogeneidade de Levene. As áreas nuclear e citoplasmática apresentaram distribuição normal. Logo, possíveis diferenças nestas variáveis, quanto aos grupos de pacientes e aos critérios morfológicos foram analisadas por meio do teste t de Student. A relação núcleo-citoplasma apresentou distribuição assimétrica. Portanto, relações desta variável com os grupos analisados e os critérios morfológicos foram investigadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). Para todos os testes estatísticos aplicados, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussões

A idade média dos participantes foi de 27,34 anos, com idade mínima de 18 anos e máxima de 70 anos, apontando que o uso de cigarros eletrônicos é mais prevalente em adultos jovens, isso pode se relacionar com o começo da vida adulta, associado com estresse e a necessidade de lidar com estados emocionais(VERAS, 2025). Em relação à distribuição por sexo, houve um equilíbrio, com 17 mulheres e 18 homens. Quanto à autodeclaração de raça/cor, a maioria identificou-se como branca (n=23), seguida de pardos (n=10) e pretos (n=2). Observou-se também que pouco mais da metade da amostra do GE é composta por estudantes (n=19). Isso fortalece a falta de medidas de educação específicas direcionadas ao público jovem.

Padrão de Uso dos Dispositivos

O tempo médio de uso de cigarros eletrônicos entre os participantes foi de 29,37 meses (aproximadamente 2 anos e 5 meses). A manutenção desse hábito prolongado pode ser diretamente associada à dependência da nicotina. Essa substância atua ligando-se aos receptores nicotínicos dos neurônios dopaminérgicos, o que induz a liberação de dopamina, resultando em prazer, relaxamento e posteriormente, adicção do usuário(FRANCO et. al., 2024). O uso dos dispositivos é feito de maneira diária por 28 participantes (80%), e 3 a 5 vezes por semana por 7 participantes (20%), o que evidencia ainda mais alto o poder de adicção presente nos DEFs. Quanto às marcas dos dispositivos eletrônicos para fumar (DEFs) mais utilizadas, destacaram-se: Ignite (n=15), seguido por Elfbar (n=7) e Masking (n=3). Outros 10 participantes relataram o uso de outras marcas/tipos (Nicksalt, Lifepodeco, Waka, Oxbarr e vaporizadores genéricos). Visto isso, não há a padronização de substâncias entre as marcas, ademais, a comercialização ilegal impede que se saiba com precisão todas as substâncias que estão sendo inaladas pelos usuários. Dessa forma, observa-se o uso de substâncias tóxicas e cancerígenas tais como: metais pesados, níquel, chumbo, cromo e cobre. Além disso, há substâncias conhecidas como Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e Hidrocarbonetos (Ward et al., 2020).

Hábitos de Higiene Bucal

De modo geral, os hábitos de higiene bucal não apresentaram disparidades que pudessem criar um viés nesse aspecto entre os grupos. Ambos demonstram uma rotina estabelecida de escovação e uso de creme dental. O uso de limpador de língua foi semelhante entre os grupos (10 indivíduos por grupo), e a utilização de enxaguatório bucal apresentou números muito próximos (16 no GE e 13 no GC).

Hábitos Parafuncionais

O perfil de hábitos parafuncionais revelou diferenças notáveis, podendo estar relacionado a fatores como ansiedade e estresse(VERAS, 2025). O hábito de morder a unha ou cutícula foi substancialmente maior no Grupo Estudo, acometendo mais da metade da amostra (n=19), em contraste com apenas 8 indivíduos no Grupo Controle. Nesse sentido, o cigarro eletrônico parece proporcionar um mecanismo de fuga à realidade, uma vez que, proporciona uma sensação de prazer e relaxamento, a fim de mitigar os efeitos da ansiedade e estresse. O ranger de dentes (bruxismo) também foi superior no GE (n=8) quando comparado ao GC (n=3). O hábito de ranger os dentes também está relacionado principalmente a fatores emocionais, o que corrobora o uso de DEFs de maneira

alternativa. O apertamento dentário foi relatado por 11 participantes do GC 8 do GE. Esses achados podem revelar modos distintos de lidar com as tensões emocionais e seus impactos no sistema estomatognático, levando a um estresse muscular e maior ocorrência de apertamento dental. No tocante ao hábito de morder a bochecha, 10 participantes em cada grupo relataram essa forma de agressão à mucosa bucal. O hábito de morder a bochecha pode estar relacionado a outros fatores como: arestas dentárias irritantes ou restaurações mal-adaptadas, má oclusão produzindo mordida crônica na mucosa, aparelhos ortodônticos e próteses removíveis (TOMMASI, 2014).

Resultados Morfológicos e Citomorfométricos

A análise das células da mucosa jugal revelou diferenças importantes entre os grupos estudados, evidenciando o impacto do uso de cigarros eletrônicos no revestimento epitelial da mucosa bucal.

Aspectos Morfológicos

A avaliação morfológica demonstrou maior ocorrência de alterações celulares no Grupo Estudo (GE) quando comparado ao Grupo Controle (GC). Destaca-se que 100% da amostra do GE (n=35) apresentou hiperceratose, reatividade nuclear e metacromasia, enquanto no GC esses achados estavam presentes em 45,7%, 62,9% e 91,4% dos indivíduos, respectivamente. A ocorrência dessas alterações pode ser justificada pelos diferentes estímulos agressivos inerente a cada grupo.

Em relação à hiperceratose, a ocorrência no GC sugere uma associação aos hábitos parafuncionais observados na amostra, tais como morder a bochecha, a língua e o apertamento dentário, aspectos que foram observados com maior frequência neste grupo (NEVILLE et al., 2016). Já no GE, além da possível influência mecânica desses mesmos atos, a hiperceratose da amostra foi potencializada pela agressão térmica provocada pelo uso do cigarro eletrônico em conjunto com hábitos parafuncionais. A agressão térmica pode atuar como um forte indutor de queratinização da mucosa jugal como mecanismo de adaptação tecidual. A reatividade nuclear acompanha essa reação fisiopatológica. No GC, esse achado relaciona-se predominantemente ao trauma mecânico oriundo dos hábitos parafuncionais, bem como aos processos inflamatórios subjacentes, de reparação e de cicatrização da mucosa. Em contrapartida, no GE, a reatividade nuclear reflete não apenas essa resposta ao trauma mecânico, sobretudo, as injúrias química e térmica provenientes da vaporização.

A metacromasia, caracterizada pela alteração da coloração citoplasmática em virtude do aumento da atividade metabólica celular, apresenta frequentemente associada a quadros de inflamação, regeneração, reparo tecidual, trauma crônico e queratinização (CARVALHO, 2002).A expressiva taxa desse achado no GC 91,4% pode ser consequente aos hábitos parafuncionais, com destaque para o hábito de morder a bochecha. No GE a metacromasia ocorreu na totalidade da amostra, sugerindo relação entre os hábitos parafuncionais mecânicos e as agressões próprias do cigarro eletrônico, de tal maneira que potencializa a resposta inflamatória e a elevação da demanda metabólica da célula.

Outras alterações estruturais citoplasmáticas apresentaram uma ocorrência maior nos usuários de Dispositivos Eletrônicos para Fumar (DEFs). O dobramento ou apagamento da borda citoplasmática foi o achado mais frequente no GE (91,4%), enquanto afetou

48,6% do GC. A presença de halo perinuclear foi observada em 88,6% do GE, contra 25,7% do GC, enquanto a pseudoeosinofilia em células parabasais e intermediárias esteve presente em 85,7% dos usuários de DEFs e em 31,4% dos participantes do GC. Somado ao comprometimento estrutural, os indicadores de estresse tecidual e morte celular foram substancialmente mais elevados no GE. A cariopicnose em células basais e intermediárias foi observada em 2,9% dos participantes do GC e 45,7% do GE. A cariorrexe não foi observada no GC, mas foi detectada em 28,6% dos participantes do GE. A carriorexe pode ser exacerbada quando foi associado o uso de DEFs ao uso do álcool (SILVA et al., 2024). Também foram observadas alterações na divisão celular, como multinucleação observada em 20% do GE e 2,9% do GC e a presença de micronúcleos, GE (11,4%) e GC (2,9%). Isto posto, há uma maior frequência em usuários de e-cigarro devido ao dano genotóxico causado pelos componentes do tabaco que interferem no processo de mitose durante a fase de anáfase e levam à formação de micronúcleos (SILVA et al., 2024), reforçam o quadro de instabilidade nuclear.

No tocante à presença de leucócitos polimorfonucleares, no GE foi considerada moderada (51,4%) e intensa em 17,1% dos casos. Essas alterações citomorfológicas observadas corroboram a literatura ao demonstrar um padrão de desorganização estrutural no citoplasma e no núcleo das células do epitélio oral (CARVALHO, 2002). A elevada frequência desses achados no GE reflete um comprometimento significativo da integridade celular nos usuários de dispositivos eletrônicos para fumar.

Foram observados eventos como a cariopicnose, caracterizados pela condensação intensa da cromatina e redução do volume nuclear,assim como, a cariorrexe, que significa a fragmentação do núcleo, refletem um processo de degeneração e morte celular acelerada no epitélio oral (CARVALHO, 2002). Além disso, no GE foram observadas alterações na divisão celular que levam à multinucleação e o recrutamento de células inflamatórias, principalmente em leucócitos polimorfonucleares, com intensidade moderada a severa. Importante ressaltar que tais achados degenerativos e reacionais devem ser interpretados em conjunto com os critérios citológicos clássicos de malignidade observados também no GE, tais como, o aumento da relação núcleo citoplasma.

Gráfico 1

Avaliação Citomorfométrica

A análise citomorfométrica, avaliada por meio do teste t de Student, revelou diferenças estatisticamente significativas na dimensão nuclear das células. A média da área nuclear no GE foi de 54,276 µm² (variação de 42,295 a 71,261 µm²), apresentando-se significativamente diferença estatística do que a do GC, cuja média foi de 38,196 µm² (variação de 21,280 a 62,242 µm²). Apesar de o aumento do núcleo ter significância estatística e ser um achado importante, não se pode inferir que ele, isoladamente, seja suficiente para o diagnóstico de malignidade. Esse achado deve ser interpretado em associação com outras alterações citomorfológicas, visto que processos inflamatórios, degenerativos também podem ocasionar o aumento nuclear. Dessa forma, o aumento do núcleo não possui especificidade quando avaliado de forma isolada, devendo ser interpretado em conjunto com outros critérios de malignidade, tais como hipercromasia, pleomorfismo, alterações associadas à cromatina e, principalmente, a irregularidade da membrana nuclear (CARVALHO, 2002).

Em relação à área citoplasmática, observou-se uma discreta redução no GE, com média de 2188,998 µm² (variação de 1318,744 a 3130,055 µm²) em comparação aos 2381,103 µm² do GC (variação de 1268,598 a 3221,591 µm²). No entanto, essa diferença não atingiu significância estatística.

Relação Núcleo-Citoplasma

A alteração nas dimensões celulares refletiu diretamente na proporção entre o núcleo e o citoplasma. O teste de Mann-Whitney demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O GE apresentou uma mediana da relação núcleo-citoplasma de 0,025 (variação total de 0,016 a 0,045), indicando um aumento proporcional do núcleo em relação ao tamanho total da célula quando comparado ao GC, que obteve mediana de 0,016 (variação de 0,011 a 0,035).

O aumento da relação núcleo/citoplasma no GE constitui um dos principais critérios citomorfológicos de malignidade, caracterizado pela expansão proporcional do volume nuclear em relação ao citoplasma (NAYAR; SUNDHARAM, 2003). Esse padrão está associado à perda da maturação celular e ao aumento da atividade proliferativa, sendo amplamente descrito na literatura em células com atipias epiteliais e lesões malignas da cavidade oral (CARVALHO, 2002). A ocorrência mais elevada dessa alteração entre os usuários de cigarro eletrônico sugere a presença de modificações citomorfológicas relevantes no epitélio oral, indicando um impacto direto na dinâmica e no comportamento celular induzido pelo uso dos DEFs.

Por fim, conclui-se que o uso contínuo de dispositivos eletrônicos para fumar e a presença concomitante de alterações citomorfológicas, como o aumento da relação núcleo/citoplasma e demais achados estruturais e nucleares que podem, a longo prazo, induzir modificações definitivas nas células da mucosa oral, constituindo um cenário propício para a potencial transformação em células malignas.

Gráfico 2

Conclusão

Conclui-se que o uso de dispositivos eletrônicos para fumar induz alterações citomorfológicas significativas e constitui um cenário propício para a potencial transformação maligna das células do epitélio oral. A avaliação morfológica demonstrou uma prevalência substancialmente maior de atipias no GE. Ao associar todos esses achados morfológicos e inflamatórios ao aumento significativo da relação núcleo/citoplasma, conclui-se que o uso contínuo de cigarros eletrônicos promove modificações citomorfológicas profundas no núcleo e no citoplasma celular. Esse conjunto de agressões contínuas torna mais suscetível a alterações celulares na mucosa oral, sendo assim, altamente propício para o desenvolvimento de atipias severas e a subsequente transformação em células malignas a longo prazo.

Referências

BARUFALDI, L.A., GUERRA, R.L, ALBUQUERQUE, R.C.R. et al. Risco de iniciação ao tabagismo com o uso de cigarros eletrônicos: revisão sistemática e meta-análise. Ciência & Saúde Coletiva, v. 26, n.12, p. 6089-6103, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 46, de 28 de agosto de 2009. Dispõe sobre a proibição de comercialização, importação e propaganda de dispositivos eletrônicos para fumar. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 119, 31 ago. 2009.

CARVALHO, G. Citologia oral. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 159 p. ISBN 85-7309-540.

DOLL R, PETO R, BOREHAM J, SUTHERLAND I. 2004. Mortality in relation to smoking: 50 years observations on male British doctors. BMJ. 328(7455):1519.

FRANCO, Jhonatan dos Santos et al. Cigarros eletrônicos e a dependência de nicotina: análise dos mecanismos neurobiológicos. Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences, [S.l.], v. 6, n. 11, p. 2448–2464, 2024. Disponível em:https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n11p2448-2464

GALLAGHER, K.P.D.; VARGAS, P.A.; SANTOS-SILVA, A.R. The use of E-cigarettes as a risk factor for oral potentially malignant disorders and oral cancer: a rapid review of clinical evidence. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, v. 29, n. 1, p. e18–e26, 2024. DOI: doi:10.4317/medoral.26042

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Vaping devices (electronic cigarettes) [Internet]. 2020 [acessado 2023 july 09]. Disponível em:

www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/vaping-devices-electronic-cigarettes.

NAYAR, A. K.; SUNDHARAM, B. Sivapatha. Cytomorphometric analysis of exfoliated normal buccal mucosa cells. Indian Journal of Dental Research, v. 14, n. 2, p. 87–93, abr./jun. 2003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14705452/.

NEVILLE, Brad W.; DAMM, Douglas D.; ALLEN, Carl M.; CHI, Angela C. Patologia oral e maxilofacial. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

OGDEN, G.R., COWPE, J.G., GREEN, M.W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. J Oral Pathol Med. v.19, n. 2, p. 53-5, 1990 Feb.

PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 42, n. 2, p. 193-206, 1941.

PARK, Jin-Ah; CROTTY ALEXANDER, Laura E.; CHRISTIANI, David C. Vaping and lung inflammation and injury. Annual Review of Physiology, v. 84, p. 611–629, 2022. DOI: 10.1146/annurev-physiol-061121-040014.

SILVA, L.A. et al. Implicações do uso do cigarro eletrônico “vape” na saúde bucal – síntese de evidências atuais. REVISA, v. 13, n. 3, p. 661–671, 2024. DOI:https://doi.org/10.36239/revisa.v13.n3.p661a671

TOMMASI, M.H.M. Diagnóstico em patologia bucal. 4. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2014.

VERAS, A. A. N. Dispositivos Eletrônicos para Fumar (DEFs) entre jovens: riscos emergentes e possibilidades de compreensão pela Terapia Cognitivo-Comportamental. 2025. 28 f. Monografia (Graduação em Psicologia Clínica) – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Rio de Janeiro, 2025

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. The health consequences of smoking—50 years of progress: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2014.

WALLACE, A. M.; FORONJY, R. E. Electronic cigarettes: not evidence-based cessation. Tobacco Control, v. 28, n. 4, p. 443–445, 2019. DOI: 10.21037/tlcr.2019.03.08.

WANG, Guanghe; LIU, Wenjing; SONG, Weimin. Toxicity assessment of electronic cigarettes. Inhalation Toxicology, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 259-273, set. 2019. DOI: 10.1080/08958378.2019.1671558.

WARD, A. M.; YAMAN, R.; EBBERT, J. O. Electronic nicotine delivery system design and aerosol toxicants: a systematic review. PLOS ONE, v. 15, n. 6, e0234189, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0234189

Anexos



Gráfico 1



Gráfico 2

CÓDIGO: SB0471

AUTOR: MARIA EDUARDA CAVALCANTE FERNANDES TELES

ORIENTADOR: DANIEL CARLOS FERREIRA LANZA

TÍTULO: Além da Contaminação Sanguínea: Avaliação de Fatores Pré-Analíticos na Detecção Molecular de HPV

Resumo

A fase pré-analítica exerce papel fundamental na qualidade dos testes moleculares para detecção do HPV. Este estudo avaliou possíveis fatores interferentes em amostras cervicais coletadas de mulheres com infecção por HPV ou lesões cervicais associadas. A qualidade das amostras foi analisada por meio da amplificação do gene β-actina. Inicialmente, a ausência de amplificação em algumas amostras foi atribuída à presença de sangue, levando à introdução de uma etapa de lavagem das escovas cervicais antes da extração do DNA. Entretanto, falhas também foram observadas em amostras sem sangue visível, sugerindo a influência de outros fatores pré-analíticos, como baixa celularidade, degradação do material genético e perdas celulares durante o processamento. Os resultados demonstram que a qualidade das amostras depende de múltiplas variáveis e reforçam a importância da padronização dos procedimentos para aumentar a confiabilidade do diagnóstico molecular do HPV.

Palavras-chave: HPV; fase pré-analítica; PCR; DNA; amostras cervicais.

TITLE: Beyond Blood Contamination: Assessing Pre-Analytical Factors Affecting Molecular Detection of Human Papillomavirus in Cervical Samples

Abstract

The pre-analytical phase plays a fundamental role in the quality and reliability of molecular diagnostic tests. In human papillomavirus (HPV) detection by polymerase chain reaction (PCR), blood contamination is often considered a major interfering factor due to its potential inhibitory effect on DNA amplification. However, other variables related to sample collection, handling, and processing may also significantly affect molecular test performance. This study evaluated potential pre-analytical factors

affecting cervical samples collected from women diagnosed with HPV infection or HPV-associated cervical lesions attending a colposcopy outpatient clinic. Sample quality was assessed through amplification of the β-actin housekeeping gene. Initially, amplification failure in some samples was attributed to blood contamination, leading to the introduction of a cervical brush washing step with ultrapure water before DNA extraction. However, amplification failure was also observed in samples without visible blood contamination, suggesting the involvement of additional pre-analytical factors, including low cellularity, DNA degradation, and cellular loss during processing. These findings demonstrate that sample quality depends on multiple variables and highlight the importance of standardized pre-analytical procedures to improve the reliability of molecular HPV diagnosis.

Keywords: HPV; pre-analytical phase; PCR; DNA extraction; cervical samples.

Introdução

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) representa um importante problema de saúde pública devido à sua associação com lesões intraepiteliais cervicais e câncer do colo do útero. Atualmente, os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são amplamente utilizados para a detecção viral por apresentarem elevada sensibilidade e especificidade. Entretanto, a qualidade dos resultados obtidos não depende exclusivamente da metodologia empregada, mas também das condições da amostra submetida à análise.

A fase pré-analítica engloba todas as etapas anteriores ao processamento laboratorial, incluindo coleta, acondicionamento, transporte, armazenamento e manipulação das amostras. Diversos fatores podem comprometer a recuperação do DNA e, consequentemente, o desempenho da PCR, entre eles a presença de sangue, a baixa celularidade da amostra, a degradação do material genético e procedimentos inadequados de processamento.

Na rotina laboratorial, a presença de sangue frequentemente recebe atenção especial por ser considerada um potencial inibidor das reações de amplificação. Contudo, a influência de outros fatores pré-analíticos nem sempre é igualmente considerada. Nesse contexto, este estudo buscou avaliar possíveis interferentes pré-analíticos em amostras cervicais destinadas à detecção molecular do HPV, investigando se a contaminação sanguínea seria realmente o principal fator associado às falhas observadas durante o processamento.

Metodologia

Trata-se de um estudo descritivo realizado com amostras cervicais coletadas de mulheres atendidas no ambulatório de colposcopia da Maternidade Escola Januário

Cicco (MEJC), referência no acompanhamento de pacientes com infecção por HPV e lesões cervicais associadas.

Foram incluídas pacientes com diagnóstico prévio de infecção por HPV, lesões intraepiteliais cervicais ou alterações identificadas por exames citológicos e colposcópicos. Além da coleta das amostras biológicas, foi aplicado um questionário contendo informações sociodemográficas e clínicas das participantes.

As amostras foram obtidas por meio de escovas cervicais e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada (LAPLIC/UFRN) para extração de DNA. A qualidade do material genético recuperado foi monitorada por meio da amplificação do gene constitutivo β-actina, utilizado como controle interno da reação.

Durante a análise das amostras observou-se ausência de amplificação da β-actina em parte dos espécimes avaliados. Inicialmente, essa ocorrência foi associada à presença de sangue em algumas escovas cervicais, levando à hipótese de interferência da contaminação sanguínea na recuperação ou amplificação do DNA. Como estratégia para minimizar esse possível efeito, foi incorporada uma etapa de lavagem das escovas com água ultrapura antes da extração do DNA. Posteriormente, os resultados obtidos foram analisados considerando a presença ou ausência de sangue visível e outros possíveis fatores relacionados à qualidade da amostra.

Resultados e Discussões

A ausência de amplificação da β-actina em determinadas amostras indicou comprometimento da qualidade do DNA recuperado ou a existência de fatores capazes de interferir na reação de PCR. Inicialmente, a observação de sangue em algumas escovas levou à hipótese de que a contaminação sanguínea seria a principal responsável pelas falhas observadas.

Entretanto, após a introdução da etapa de lavagem para remoção do sangue residual, verificou-se que algumas amostras continuavam apresentando ausência de amplificação, mesmo quando não havia sangue visível. Esse resultado sugeriu que a presença de sangue, isoladamente, não era suficiente para explicar todas as falhas observadas durante o processamento.

A partir dessas observações, outras hipóteses passaram a ser consideradas. A baixa celularidade da amostra, decorrente da obtenção insuficiente de células cervicais durante a coleta, pode resultar em quantidade inadequada de DNA para amplificação. Da mesma forma, perdas celulares durante a manipulação laboratorial podem reduzir ainda mais o rendimento da extração. Nesse contexto, a própria etapa de lavagem introduzida para remoção do sangue pode ter contribuído para a remoção de células aderidas à escova, especialmente em amostras inicialmente pobres em material biológico.

Além disso, fatores relacionados ao armazenamento, transporte e integridade do material genético também podem influenciar a qualidade final da amostra. Os achados obtidos reforçam que a fase pré-analítica deve ser compreendida como um processo multifatorial, no qual diferentes variáveis podem atuar simultaneamente sobre o desempenho das análises moleculares.

Os resultados sugerem que a atenção exclusiva à presença de sangue pode levar à supervalorização de um único interferente, enquanto outros fatores potencialmente relevantes permanecem subestimados. Dessa forma, estratégias voltadas para a melhoria da qualidade das amostras devem considerar não apenas a remoção de possíveis inibidores, mas também a preservação da celularidade e da integridade do material coletado.

Conclusão

Os resultados demonstram que a presença de sangue não deve ser considerada o único fator determinante para falhas na detecção molecular do HPV. Embora possa atuar como potencial interferente, a ausência de amplificação observada em amostras sem contaminação sanguínea sugere a participação de outros fatores pré-analíticos, como baixa celularidade, perda de material durante o processamento e variações na qualidade da coleta. Esses achados destacam a importância da avaliação global da fase pré-analítica e da padronização dos procedimentos laboratoriais, contribuindo para maior confiabilidade dos testes moleculares empregados no diagnóstico do HPV.

Referências

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Journal of Biomolecular Techniques. 2004;15(3):155–166.

Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2011;49(7):1113–1126.

Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, Bowen RA, Church S, Delanghe J, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2013;51(1):229–241.

Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2010;8(10):1139–1162.

Cuschieri K, Cubie H. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. Journal of Clinical Virology. 2005;32(Suppl 1):S34–S42.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection. 2004;10(3):190–212.

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology. 2012;113(5):1014–1026.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clinical Microbiology Reviews. 2003;16(1):1–17.

Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. The Lancet Global Health. 2020;8(2):e191–e203.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vaccine. 2012;30(Suppl 5):F55–F70.

CÓDIGO: SB0474

AUTOR: RAISSA GABRIELLY NASCIMENTO MATIAS

ORIENTADOR: ALIANDA MAIRA CORNELIO DA SILVA

TÍTULO: A antinocicepção induzida pelo medo e ansiedade provocada por estímulos aversivos é modulada por neurotransmissores canabinóides? Uma revisão integrativa

Resumo

Diante de estímulos aversivos é comum a ativação de mecanismos defensivos, que podem incluir uma redução temporária na sensibilidade à dor e envolvem diversos sistemas neuroquímicos. Contudo, ainda não está claro o envolvimento da neurotransmissão canabinóide nessa via. Assim, o presente trabalho objetivou elucidar o envolvimento da via endocanabinoide na modulação da antinocicepção induzida por medo e ansiedade. Foi adotada a metodologia de revisão integrativa da literatura, com buscas nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science, com critérios bem definidos de inclusão, exclusão e elegibilidade. Os estudos tiveram seus dados coletados e risco de viés metodológico avaliado. Foi observado que os endocanabinoides, como a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol, modulam a dor especialmente pelo receptor CB1, em áreas-chave como a amígdala, o hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal e a medula espinhal. Os testes que evidenciaram a ativação do sistema canabinoide foram o estresse de imobilização, o choque nas patas e o estresse de natação como estímulos aversivos, e os testes nociceptivos como teste de formalina, placa quente, teste plantar e movimento de cauda. Os dados reunidos possibilitam uma compreensão mais ampla da interação entre estímulos aversivos e nocivos, revelando como a exposição a esses estímulos pode modular os circuitos neurobiológicos da nocicepção.

Palavras-chave: Canabinóides. Endocanabinóides. Antinocicepção. Medo. Ansiedade.

TITLE: The Modulation of Fear- and Anxiety-Induced Antinociception by Cannabinoid Neurotransmitters in Response to Aversive Stimuli: An Integrative Review

Abstract

Faced with aversive stimuli, the activation of defensive mechanisms commonly occurs and may include a temporary reduction in pain sensitivity, involving several neurochemical systems. However, the involvement of cannabinoid neurotransmission in this pathway remains unclear. Therefore, this study aimed to elucidate the involvement of the endocannabinoid system in the modulation of fear- and anxiety-induced antinociception. An integrative literature review was conducted through searches in PubMed, Scopus, and Web of Science, following well-defined inclusion, exclusion, and eligibility criteria. Data were extracted from the selected studies, and their methodological risk of bias was assessed. The findings showed that endocannabinoids, such as anandamide and 2-arachidonoylglycerol, modulate pain primarily through the CB1 receptor in key areas, including the amygdala, hypothalamus, periaqueductal gray matter, and spinal cord. The tests that demonstrated activation of the cannabinoid system included immobilization stress, footshock, and forced swimming as aversive stimuli, as well as nociceptive tests such as the formalin test, hot plate test, plantar test, and tail-flick test. The findings provide a broader understanding of the interaction between aversive and nociceptive stimuli, revealing how exposure to these stimuli may modulate the neurobiological circuits involved in nociception.

Keywords: Cannabinoids. Endocannabinoids. Antinociception. Fear. Anxiety.

Introdução

Diante de situações inatas ou aprendidas de ameaça, é comum a manifestação de comportamentos defensivos, como luta, fuga, congelamento, vocalizações; e respostas neurovegetativas, como taquicardia, hipertensão, defecação, caracterizando uma reação de medo [1]. Frequentemente, essas reações vêm acompanhadas de antinocicepção [2,3], compondo um sistema adaptativo que favorece a sobrevivência diante de perigos reais ou percebidos. Esses estados emocionais, como o medo e ansiedade, podem modular a percepção da dor, caracterizando redução temporária da sensibilidade à dor, fenômeno conhecido como analgesia induzida pelo estresse (do inglês- stress-induced analgesia, SIA) [4].

Em 2020, a definição de dor da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) foi revisada e definida como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a um dano tecidual real ou potencial" [5]. A dor é responsável por dificultar a execução de ações fisiológicas e de defesa, o que exalta a relevância do mecanismo da SIA. Nesse contexto, é importante destacar que a forma como essas respostas se expressam pode variar conforme fatores ambientais e biológicos, como ontogenia, genética e fisiologia dos indivíduos [6].

Quando observados sob o ponto de vista da neuroquímica, os endocanabinóides exercem papel importante na resolução da dor aguda e estão elevados em regiões ligadas à dor crônica, funcionando como analgésicos endógenos [7,8]. Em 2004, Finn et

al. demonstraram que o antagonista CB1 rimonabanto bloqueou a antinocicepção induzida por formalina em ratos reexpostos a um contexto aversivo condicionado com choque nas patas [9,10]. Tais achados indicam que, embora os endocanabinóides atuem na medula espinal, a resposta antinociceptiva condicionada pelo medo depende da sinalização via CB1 em regiões supraespinhais como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e bulbo ventromedial rostral (RVM). Além disso, estudos com camundongos knock-out para o receptor CB1 mostraram ausência de antinocicepção opióide após teste de imersão da cauda, sugerindo interação entre os sistemas opióide e endocanabinóide [11,12].

Neste contexto, investigar e explicar a influência de eventos aversivos na percepção da dor auxilia no entendimento dos impactos fisiológicos de eventos traumáticos no sistema nervoso[13,14]. No entanto, o envolvimento dos neurotransmissores canabinóides ainda precisa ser elucidado [15]. Diante disso, o presente estudo propõe revisar a literatura científica para responder à questão: a antinocicepção induzida pelo medo e ansiedade, em modelos animais etiológicos e não etológicos, é modulada por neurotransmissores canabinóides? E assim identificar lacunas e fatores que influenciam a eficácia desse sistema na modulação da dor, contribuindo para futuras investigações.

Metodologia

Estratégia de busca

Foi realizada uma busca sistemática da literatura em dezembro de 2025, utilizando as bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science. A estratégia de busca empregou a seguinte combinação de termos: ("fear-induced antinociception" OR "stress-induced hyperalgesia" OR "stress-induced analgesia" OR "stress-induced antinociception") AND ("cannabinoid" OR "anandamide" OR "tetrahydrocannabinol" OR "2-arachidonoyl glycerol" OR "THC").

Critérios de seleção

Durante a triagem dos títulos e resumos, foram aplicados critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: (1) estudos indexados nas bases PubMed, Web of Science e/ou Scopus; (2) estudos que apresentassem os termos de busca previamente definidos no título ou resumo; e (3) estudos publicados a partir do ano 2000. Os critérios de exclusão foram: (1) estudos que não utilizassem modelos experimentais com animais; (2) publicações na forma de capítulos de livros, teses ou resumos de congressos; e (3) artigos que não estivessem disponíveis em texto completo ou que não fossem publicados em inglês.

Processo de seleção dos estudos

A triagem foi realizada de forma independente e às cegas por dois pesquisadores, utilizando a plataforma online Rayyan. Eventuais divergências foram resolvidas mediante consulta a um terceiro revisor. Posteriormente, os textos completos dos

estudos selecionados foram avaliados quanto à elegibilidade. Foram excluídos os estudos que não investigassem simultaneamente os dois temas centrais da revisão: a antinocicepção e/ou hiperalgesia associada ao estresse, medo ou ansiedade e o sistema endocanabinoide; ou que apresentassem resultados que não respondessem à questão norteadora da revisão.

Coleta e extração dos dados

Dois pesquisadores realizaram, de forma independente, a extração dos dados referentes aos desfechos primários, além das seguintes informações: título do artigo, autores, data de publicação, objetivos, resultados e os testes comportamentais aversivos e nociceptivos utilizados. Também foram coletadas informações sobre os agentes farmacológicos e as moléculas canabinoides investigadas, bem como sobre outros sistemas de neurotransmissão potencialmente envolvidos nos efeitos antinociceptivos observados. Esse processo foi realizado a partir da leitura dos textos completos dos artigos incluídos. Posteriormente, os dados extraídos foram verificados por um terceiro pesquisador, a fim de garantir sua precisão e consistência.

Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés

A qualidade metodológica dos estudos foi avaliada por meio da Escala de Qualidade Metodológica (EMQ)[16]. A EMQ avalia três validades: externa, interna e de construtor. No total, a escala é composta por diferentes parâmetros e a interpretação dos escores ocorreu pela média dos valores atribuídos aos critérios, sendo valores menores que 0,5 designados como baixa qualidade metodológica, 0,5 a 0,75 como média qualidade e acima de 0,75 como alta qualidade. Esse parâmetro também é utilizado para inferir a legitimidade das evidências encontradas nos estudos e é inversamente proporcional ao risco de viés.

Análise crítica e redação final

Os dados coletados foram comparados entre si e analisados individualmente, explorando os principais modelos animais utilizados, os testes de estresse e de aversão aplicados, bem como seus respectivos desfechos experimentais. A avaliação crítica das informações coletadas foi essencial para identificar se ocorreu antinocicepção devido à neurotransmissão canabinóide, e quais os tipos de estímulos aversivos e nocivos que desencadeiam essa neurotransmissão.

Resultados e Discussões

Um total de 149 estudos foram identificados por meio de buscas em bases de dados eletrônicas. Desses, 32 registros duplicados foram removidos utilizando ferramentas automatizadas. Os 117 estudos restantes passaram por uma triagem de títulos e resumos, e 77 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão. 40 foram avaliados quanto à elegibilidade do texto completo; destes, 7 foram excluídos por atenderem aos critérios de exclusão e 4 foram excluídos por não preencherem os critérios de

elegibilidade. Consequentemente, 29 estudos foram incluídos para extração e análise de dados, conforme ilustrado na Figura 1 por meio do fluxograma PRISMA.

O risco de viés de cada estudo incluído foi avaliado de forma independente utilizando três domínios de validade. A validade externa avaliou os procedimentos de seleção dos participantes, a atribuição ou perda de unidades amostrais e o tratamento de dados ausentes, resultando em uma pontuação média de 0,71 ± 0,25 entre os estudos incluídos. A validade interna avaliou o delineamento metodológico, o momento das medições dos desfechos e a adequação das estratégias de controle, apresentando uma pontuação média de 0,94 ± 0,09. A validade de construto, que obteve pontuação média de 1,00, avaliou a padronização das variáveis e a clareza e consistência das definições dos desfechos. De modo geral, com base no sistema de pontuação MQS, a maioria dos estudos (89,7%) foi classificada como apresentando baixo risco de viés, enquanto 10,3% foram classificados como apresentando risco moderado de viés. A síntese qualitativa das evidências e a avaliação do risco de viés são apresentadas na Figura 2, gerada por meio da ferramenta de visualização Robvis, em conformidade com as recomendações do PRISMA 2020.

As principais características metodológicas e experimentais dos estudos incluídos estão resumidas no Quadro 1. A análise indica que os modelos animais empregados foram predominantemente roedores, sendo os ratos responsáveis por 65,5% das amostras e os camundongos por 34,5%. Em relação à distribuição temporal, não foi observado um aumento progressivo no número de publicações ao longo do período analisado (2004–2025), mantendo-se a produção científica relativamente estável. O ano de 2020 apresentou o maior número de estudos incluídos (n = 4), enquanto, nos demais anos, o número de publicações variou entre uma e três.

Os estudos incluídos utilizaram diferentes modelos de estresse, ansiedade e medo, classificados em estímulos físicos, comportamentais e farmacológicos, enquanto os testes nociceptivos foram agrupados em modalidades químicas, mecânicas, térmicas e mistas. O paradigma aversivo mais empregado foi o choque nas patas (foot shock) (44,8%), e o teste nociceptivo mais frequente foi a injeção de formalina (37,9%). A combinação entre esses dois modelos foi a mais investigada, demonstrando, na maioria dos estudos, participação do sistema endocanabinoide na antinocicepção, principalmente por meio do aumento dos níveis de anandamida (AEA) após a inibição da FAAH e da ativação de receptores CB1 no córtex pré-frontal[16,17]. Apenas um estudo não identificou esse mecanismo como predominante, sugerindo influência de diferenças metodológicas, como o modelo experimental e a linhagem animal.

Modelos que associaram choque nas patas ao teste de retirada da cauda também demonstraram antinocicepção robusta dependente de receptores CB1, uma vez que o antagonista rimonabanto aboliu esse efeito, diferentemente da naltrexona, indicando predominância de mecanismos não opioides[18]. Em contraste, protocolos de contenção associados ao teste da placa quente apresentaram resultados heterogêneos, evidenciando participação variável dos receptores CB1 e possível redundância entre os sistemas endocanabinóide e opióide. Além disso, no modelo de medo induzido por NMDA, observou-se envolvimento concomitante de receptores CB1 e μ-opióides, embora atuando por vias independentes[19].

A ativação farmacológica dos receptores CB1 promoveu antinocicepção consistente na maioria dos modelos experimentais, reduzindo respostas nociceptivas e aumentando a

tolerância a estímulos dolorosos, inclusive compensando parcialmente a inibição da via opióide em alguns protocolos[19]. Além disso, a administração intracerebral de 2-AG reduziu as respostas relacionadas ao medo e aumentou os níveis de AEA. Entretanto, essa resposta não foi uniforme em todos os modelos, sendo menos consistente na natação forçada, em que fatores genéticos parecem influenciar a participação do sistema endocanabinoide[21]. De forma complementar, o bloqueio dos receptores CB1 por rimonabanto reduziu significativamente a analgesia induzida pelo estresse e pelo medo em diferentes regiões do sistema nervoso central, reforçando o papel central dessa via na modulação descendente da dor.

Alguns modelos, contudo, demonstraram resultados divergentes. No estresse por imobilização associado à formalina, o agonista WIN55,212-2 não alterou a resposta antinociceptiva[21]. Da mesma forma, na amígdala basolateral, o bloqueio de CB1 reduziu a nocicepção apenas em animais não condicionados ao medo [22]. Já nos modelos de natação forçada, o envolvimento do sistema endocanabinoide mostrou-se limitado, uma vez que o bloqueio de CB1 não modificou significativamente a analgesia observada[23]. Diferenças entre linhagens animais também influenciaram os resultados: camundongos HA/LA e ratos Sprague-Dawley e Wistar Kyoto apresentaram respostas distintas à dor após o estresse, indicando que fatores genéticos, emocionais e relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal modulam a participação dos endocanabinóides na analgesia induzida pelo estresse[20,23,24].

A inibição da enzima FAAH por URB597 promoveu aumento consistente dos níveis de AEA e redução dos comportamentos nociceptivos em modelos envolvendo choque, formalina e outros estímulos aversivos, reforçando que a potencialização da sinalização endocanabinoide intensifica a analgesia induzida pelo estresse em diferentes regiões encefálicas, incluindo córtex pré-frontal, hipocampo ventral e estruturas mesencefálicas.

Os resultados desta revisão demonstram que o sistema endocanabinóide desempenha papel importante na analgesia induzida pelo estresse (Stress-Induced Analgesia – SIA), porém sua participação depende do tipo de estímulo aversivo, do teste nociceptivo e dos circuitos neurais envolvidos[25]. De modo geral, os receptores CB1 mostraram-se os principais mediadores da antinocicepção supramedular, enquanto a inibição das enzimas FAAH e MAGL potencializou essa resposta ao aumentar a disponibilidade de endocanabinoides[26,27].

Os achados sugerem que a participação do sistema endocanabinoide apresenta uma "dupla especificidade": depende tanto da natureza do estressor quanto do circuito neural recrutado. Modelos envolvendo choque nas patas e contenção demonstraram participação consistente dos endocanabinoides, enquanto a natação forçada apresentou resultados mais variáveis, frequentemente associados ao predomínio da neurotransmissão opioide[23, 20, 28]. Entre os principais mediadores, o 2-AG mostrou atuação mais consistente na ativação das vias descendentes inibitórias da dor, enquanto a AEA apresentou efeitos dependentes do contexto experimental, provavelmente devido à sua interação tanto com receptores CB1 quanto com canais TRPV1[16,28,29,30].

Além da neurotransmissão endocanabinoide, a SIA resulta da interação entre diferentes sistemas neuroquímicos. Os sistemas opióide e endocanabinoide podem atuar de forma complementar ou compensatória, enquanto neurotransmissores como serotonina e colecistocinina também influenciam a intensidade da resposta antinociceptiva[32, 33].

Apesar da predominância de evidências favoráveis, alguns estudos não identificaram participação significativa do sistema endocanabinoide na SIA. Essas divergências parecem estar relacionadas às diferenças entre espécies e linhagens animais, intensidade do estressor e protocolos experimentais utilizados, evidenciando a necessidade de cautela na generalização dos resultados[23]. Em conjunto, os achados indicam que o sistema endocanabinóide é um importante modulador da analgesia induzida pelo medo e pelo estresse, porém sua atuação depende da interação entre o tipo de ameaça, os circuitos neurais recrutados e o estado fisiológico do organismo[25,33].

Conclusão

Esta revisão demonstrou que o sistema endocanabinóide desempenha papel fundamental, porém dependente do contexto, na analgesia induzida pelo estresse (SIA). Os receptores CB1 destacam-se como os principais mediadores supramedulares da antinocicepção, especialmente em modelos de ameaça previsível, como choque nas patas e estresse por contenção. Nesse processo, o 2-AG atua de forma consistente na modulação descendente da dor, enquanto a anandamida (AEA) apresenta efeitos variáveis, podendo exercer ações antinociceptivas ou pronociceptivas conforme o contexto experimental. Entre os modelos avaliados, aqueles baseados em choque nas patas, principalmente quando associados à injeção de formalina ou ao teste de retirada da cauda, apresentaram as evidências mais consistentes da participação do sistema endocanabinoide, com ativação de receptores CB1 e aumento dos níveis de AEA e 2-AG. Em contrapartida, os modelos de natação forçada mostraram participação reduzida ou inconsistente desse sistema, com predomínio da neurotransmissão opioide e influência de fatores como linhagem animal e perfil emocional. A variabilidade observada entre os diferentes paradigmas sugere que o sistema endocanabinóide não atua como mediador universal da analgesia induzida pelo estresse, mas como um modulador cuja ativação depende da interação entre o tipo de estímulo aversivo, o circuito neural recrutado e outros sistemas neurotransmissores, como os sistemas opióide e noradrenérgico.

Referências

1. DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. Journal of Psychopharmacology, v. 5, n. 4, p. 305–315, 1991.

2. KELLY, D. D. The role of endorphins in stress-induced analgesia. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 398, p. 260–271, 1982.

3. BIAGIONI, A. F.; SILVA, J. A.; COIMBRA, N. C. Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 45, n. 4, p. 328–336, 2012.

4. BUTLER, R. K.; FINN, D. P. Stress-induced analgesia. Progress in Neurobiology, v. 88, n. 3, p. 184–202, jul. 2009.

5. DE SANTANA, J. M. et al. Definition of pain revised after four decades. Brazilian Journal of Pain, v. 3, n. 3, 2020.

6. MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. Science, v. 150, n. 3699, p. 971–978, 19 nov. 1965.

7. GREGG, L. C. et al. Activation of Type 5 Metabotropic Glutamate Receptors and Diacylglycerol Lipase-Initiates 2-Arachidonoylglycerol Formation and Endocannabinoid-Mediated Analgesia. Journal of Neuroscience, v. 32, n. 28, p. 9457–9468, 11 jul. 2012.

8. ALKAITIS, M. S. et al. Evidence for a Role of Endocannabinoids, Astrocytes and p38 Phosphorylation in the Resolution of Postoperative Pain. PLoS ONE, v. 5, n. 5, p. e10891, 28 maio 2010.

9. GUINDON, J. et al. Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following cisplatin treatment. Pharmacological Research, v. 67, n. 1, p. 94–109, jan. 2013.

10. AMIT, Z.; GALINA, Z. H. Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. Physiological Reviews, v. 66, n. 4, p. 1091–1120, 1 out. 1986.

11. VALVERDE, O. et al. Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. European Journal of Neuroscience, v. 12, n. 2, p. 533–539, fev. 2000.

12. FINN, D. P. et al. Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fear-conditioned analgesia by CB1 receptors. European Journal of Neuroscience, v. 20, n. 3, p. 848–852, 15 jul. 2004.

13. NIKBAKHTZADEH et al. Protagonist Role of Opioidergic System on Post-Traumatic Stress Disorder and Associated Pain. Psychiatry Investigation, v. 17, n. 6, p. 506–516, 2 jun. 2020.

14. MAENG, L. Y.; MILAD, M. R. Post-Traumatic Stress Disorder: The Relationship Between the Fear Response and Chronic Stress. Chronic Stress, v. 1, fev. 2017.

15. WOODHAMS, S. G. et al. The cannabinoid system and pain. Neuropharmacology, v. 124, p. 105–120, set. 2017.

16. CHACÓN-MOSCOSO, S.; SANDUVETE-CHAVES, S.; LOZANO-LOZANO, J. A.; HOLGADO-TELLO, F. P. The Methodological Quality Scale (MQS) for intervention programs: validity evidence. Frontiers in Psychology, v. 14, p. 1217661, jul. 2023. DOI: 10.3389/fpsyg.2023.1217661.

17. BUTLER, R. K. et al. Endocannabinoid signaling in the rat anterior cingulate cortex modulates fear-conditioned analgesia. Pain, v. 153, n. 4, p. 801–809, 2012.

18. REA, K. et al. FAAH inhibition in the prefrontal cortex medial modulates fear-conditioned analgesia and freezing. Neuropharmacology, v. 144, p. 115–124, 2019.

19. GODOI, J. B. et al. Involvement of the endocannabinoid and opioid systems in NMDA-induced fear. Behavioural Brain Research, v. 379, 112340, 2020.

20. ATWAL, G. et al. Cannabinoid receptors and stress-induced antinociception. Journal of Psychopharmacology, v. 34, n. 2, p. 185–192, 2020.

21. SEO, S. J. et al. Effect of WIN 55,212-2 on immobilization stress-induced antinociception. Korean Journal of Physiology & Pharmacology, v. 15, n. 1, p. 33–38, 2011.

22. ROCHE, M. et al. Endocannabinoid system in the basolateral amygdala and pain. Neuroscience, v. 171, p. 1300–1313, 2010.

23. YESILYURT, O. et al. CB1 receptor blockade and forced swim test analgesia. European Journal of Pharmacology, v. 764, p. 412–417, 2015.

24. JENNINGS, E. M. et al. Stress-induced hyperalgesia and emotional profile in rats. Progress in Neurobiology, v. 121, p. 1–18, 2016.

25. DE FREITAS, R. L. et al. CB1 receptors in the hypothalamus and antinociception. European Journal of Pharmacology, v. 700, p. 122–130, 2013.

26. FALCONI-SOBRINHO, L. L. et al. Neural circuits and endocannabinoid mechanisms of stress-induced analgesia. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, [Preprint/In Press], 2025.

27. LEE, M. T.; CHEN, Y. H.; MACKIE, K.; CHIOU, L. C. Median nerve stimulation as a nonpharmacological approach to bypass analgesic tolerance to morphine: a proof-of-concept study in mice. Journal of Pain, v. 21, n. 11–12, p. 1193–1205, 2020.

28. BRUCHAS, M. R.; XU, J. Z.; CHAVKIN, C. Forced swim stress and opioid neurotransmission. Psychopharmacology, v. 199, p. 234–240, 2008.

29. LAU, B. K. et al. AEA interaction with TRPV1 in experimental context. Journal of Neuroscience, v. 34, p. 1245–1255, 2014.

30. CHAHL, L. A. Endocannabinoid system and pain mechanisms. Pain Medicine, v. 25, p. 88–95, 2024.

31. SULEYMANOGLU, S. et al. Neurochemical systems and stress-induced analgesia. Pharmacology Reports, v. 76, p. 112–120, 2024.

32. STENSSON, S. et al. CCK and serotonin influence in antinociception. Neurochemistry International, v. 118, p. 45–53, 2018.

33. LANG-ILLIEVICH, K.; KLIVINYI, C.; LASSER, C. et al. Palmitoylethanolamide in the treatment of chronic pain: a systematic review and Meta-analysis of double-blind randomized controlled trials. Nutrients, v. 15, n. 6, p. 1350, 2023.

Anexos



Figura 1 - Fluxograma Prisma mostrando o caminho metodológico seguido.



Figura 2 - Gráfico com os resultados da análise de risco de viés dos estudos selecionados.



Quadro 1. Características metodológicas e experimentais gerais dos estudos incluídos na revisão.

CÓDIGO: SB0482

AUTOR: JOSÉ LUCAS VICENTE DE ARAÚJO

ORIENTADOR: LEONARDO CAPISTRANO FERREIRA

TÍTULO: Desenvolvimento de classificador molecular baseado em mRNAs e microRNAs para diagnóstico do câncer de tireoide

Resumo

Os nódulos tireoidianos são comuns em adultos e estão presentes em aproximadamente 5% da população. O diagnóstico do câncer de tireoide envolve avaliação clínica, exames de imagem e citopatologia, sendo a punção aspirativa de agulha fina (PAAF) o padrão ouro. Cerca de 20-30% dos nódulos são classificados como indeterminados, e a maioria destes pacientes são submetidos à cirurgia de retirada da tireoide. Entretanto, análises anatomopatológicas revelam que dois terços das tireoides removidas são benignas. Testes moleculares têm sido implementados para auxiliar no diagnóstico, contudo o custo elevado restringe sua aplicação. O objetivo deste estudo foi desenvolver um classificador molecular a partir de dados públicos de expressão gênica (GEO e TCGA) de miRNAs e mRNAs obtidos por PAAF. A seleção de genes foi feita aplicando o algoritmo Boruta nos conjuntos de dados de miRNA (GSE116196) e mRNA (GSE34289). Os genes selecionados foram submetidos a regressão LASSO utilizando os dados do TCGA-THCA. O modelo final apresentou acurácia de 97%, sensibilidade de 98% e especificidade de 89%. O classificador combina 3 miRNAs (hsa-mir-1307, hsa-mir-138-1, hsa-mir-708) e 3 mRNAs (GABRB2, LRP1B, STK32A), além das variáveis idade e sexo. O desempenho foi superior aos testes moleculares comerciais. Esses resultados subsidiam o desenvolvimento de um teste molecular que, caso validado prospectivamente em amostras clínicas, auxiliará no manejo de pacientes com nódulos tireoidianos indeterminados

Palavras-chave: Nódulos tireoidianos; Câncer de Tireoide; Classificador molecular

TITLE: Development of a Molecular Classifier Based on mRNAs and microRNAs for Thyroid Cancer Diagnosis

Abstract

Thyroid nodules are common in adults and are present in approximately 5% of the population. The diagnosis of thyroid cancer involves clinical evaluation, imaging studies, and cytopathology, with fine-needle aspiration (FNA) being the gold standard.

About 20–30% of nodules are classified as indeterminate, and most of these patients undergo thyroidectomy. However, histopathological analyses reveal that two-thirds of the removed thyroids are benign. Molecular tests have been implemented to aid in diagnosis, but their high cost limits widespread use. The aim of this study was to develop a molecular classifier using public gene expression data (GEO and TCGA) of miRNAs and mRNAs obtained from FNA samples. Gene selection was performed using the Boruta algorithm on miRNA (GSE116196) and mRNA (GSE34289) datasets. The selected genes were then subjected to LASSO regression using TCGA-THCA data. The final model achieved 97% accuracy, 98% sensitivity, and 89% specificity. The classifier combines 3 miRNAs (hsa-mir-1307, hsa-mir-138-1, hsa-mir-708) and 3 mRNAs (GABRB2, LRP1B, STK32A), in addition to age and sex as clinical variables. Its performance outperformed commercial molecular tests. These results support the development of a molecular test that, if prospectively validated in clinical samples, may assist in the management of patients with indeterminate thyroid nodules.

Keywords: Thyroid nodules; Thyroid cancer; Molecular classifier

Introdução

Os nódulos tireoidianos são extremamente comuns em adultos e estão presentes em aproximadamente 5% da população. Todavia, menos de 10% dos nódulos encontrados são cancerígenos, o que representa um descompasso entre alta prevalência e baixa taxa de malignidade.1,2 O câncer da tireoide é a neoplasia endócrina mais comum, e sua incidência vem crescendo nas últimas décadas, se tornando o 9° câncer mais prevalente no mundo.3,4 O carcinoma papilífero corresponde a cerca de 84% das neoplasias tireoidianas e, junto ao folicular e oncocítico, compõem os cânceres bem diferenciados. Formas menos comuns e mais agressivas incluem o carcinoma pouco diferenciado e o anaplásico. Já o câncer medular é responsável por aproximadamente 4% dos casos.5 O diagnóstico do câncer de tireoide é fundamentado em uma abordagem integrada que envolve avaliação clínica, exames de imagem e citopatologia, A ultrassonografia cervical é o método de imagem inicial e mais sensível para avaliação de nódulos tireoidianos e, também, auxilia na estratificação de risco e na decisão sobre a necessidade de punção aspirativa por agulha fina (PAAF).5-7

A Punção aspirativa de agulha fina é um método confiável e o padrão ouro para diagnosticar a neoplasia tireoidiana.3 Com o objetivo de padronizar o diagnóstico citopatológico da PAAF, o Sistema Bethesda para Relato de Citopatologia da Tireoide (TBSRTC) estabeleceu uma classificação baseada em 6 categorias citológicas: (i) não diagnóstico; (ii) benigno; (iii) atipia de significado indeterminado (AUS); (iv) neoplasia folicular; (v) suspeito de malignidade (SFM); e (vi) maligno.8 No entanto, cerca de 20-30% dos nódulos que vão para a PAAF são classificados como indeterminados (classes Bethesda III, IV e V), e nesses casos a cirurgia é encorajada. Entretanto, aproximadamente 70% das ocorrências são benignas, resultando em uma imensa quantidade de cirurgias desnecessariamente realizadas, impactando negativamente a qualidade de vida dos pacientes.9,10

Recentemente, testes de análise molecular se tornaram poderosas ferramentas de diagnóstico e têm sido implementados para aumentar a acurácia diagnóstica e auxiliar

no manejo de pacientes com nódulos tireoidianos indeterminados se utilizando de diferentes abordagens.11,12 Uma abordagem é utilizar microRNA (MiRNA) ou RNA mensageiro (mRNAs) como biomarcadores, esses genes têm sido amplamente estudados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico do câncer de tireoide. Diversos estudos demonstram que essas moléculas representam biomarcadores promissores para o câncer de tireoide, com potencial para melhorar o diagnóstico diferencial.13-18

Entretanto, os testes diagnósticos moleculares atuais para câncer de tireoide, além de enfrentarem desafios para alcançar sensibilidade e especificidade comparáveis aos métodos invasivos, apresentam limitações importantes relacionadas a custo, centralização e aplicabilidade clínica.9,12,19 Muitos desses testes, como painéis de expressão gênica, requerem equipamentos sofisticados e infraestrutura laboratorial avançada o que resulta em um elevado custo e consequente acesso limitado em regiões de baixa e média renda.

Diante deste cenário, o objetivo desse estudo foi identificar um painel combinado de miRNAs e mRNAs que se apresente diferencialmente expresso em amostras de PAAF benignas e malignas de tireóide, visando o desenvolvimento de um classificador molecular que atinja as métricas significativas para classificação de nódulos tireoidianos indeterminados e tenha um ótimo custo beneficio para ser aplicado clinicamente.

Metodologia

Coleta de amostras e divisão dos dados

Os dados de expressão gênica deste estudo foram extraídos do repositório Gene Expression Omnibus (GEO) e do The Cancer Genome Atlas (TCGA). Os conjuntos utilizados foram: GSE116196, que inclui a expressão de microRNAs em 66 amostras de PAAF de tireoide citologicamente indeterminadas e 274 citologicamente classificadas; GSE34289, contendo a expressão gênica de amostras de PAAF de mRNA em 265 amostras citologicamente indeterminadas e 99 amostras citologicamente classificadas; TCGA-THCA, conjunto proveniente do TCGA que contém expressão de miRNA e mRNA de 507 amostras histopatológicas da tireoide.

Os conjuntos de dados GSE116196 e GSE34289, obtidos do repositório GEO, foram empregados na etapa de triagem de biomarcadores, os quais, por sua vez, foram validados e refinados por meio do conjunto TCGA-TCHA.

Ferramentas utilizadas

Para análise, limpeza, preparação dos dados, geração de tabelas e gráficos e para o levantamento de métricas foram utilizados as seguintes bibliotecas em Python: pandas, numpy BorutaPy, scikit-learn, matplotlib, seaborn; e os seguintes pacotes em R: edgeR, SVA, ggplot2, dplyr.

Limpeza e preparação de dados

Para os conjuntos GSE116196 e GSE34289, foi realizada a limpeza e organização dos dados no software Rstudio, seguido pela preparação dos datasets para análise por feature selection em Python. A preparação dos dados foi realizada seguindo os respectivos passos: filtragem de genes com contagens relevantes; normalização; remoção do viés de lote através do comando ComBat do pacote SVA; colapso das replicatas técnicas; exclusão de amostras de pacientes que integravam mais de um grupo citológico (benigno, maligno e indeterminado).

Seleção de variáveis

A seleção de miRNAs e mRNAs com potencial diagnóstico nos dois conjuntos foi feita através da ferramenta feature selection utilizando a algoritmo Boruta, implementado na linguagem Python. Ao término desta etapa, os miRNAs e os mRNAs foram selecionados. Este conjunto de genes foi levado à filtragem final e validação externa nos dados provenientes do TCGA-THCA. Os miRNAs e mRNAs filtrados foram submetidos ao algoritmo LASSO para a seleção do conjunto final de genes. Ademais, o conjunto final foi treinado e validado no conjunto TCGA-THCA através do algoritmo de regressão logística.

Resultados e Discussões

Dados epidemiológicos

Os três conjuntos de dados utilizados reúnem informações demográficas e clínicas de pacientes com nódulos tireoidianos. A seguir, apresenta-se uma caracterização detalhada desses dados [tabela 1].
O dataset GSE34289, com amostras de mRNA, incluiu 265 amostras indeterminadas provenientes de 265 nódulos em 249 pacientes. Evidenciou-se predomínio feminino, com 194 mulheres (77,91%) e 55 homens (22,08%). A mediana da idade foi 51,5 anos, variando de 22 a 85 anos. Ademais, este conjunto também apresentava um acréscimo de amostras citologicamente determinadas, estas são divididas em 44 nódulos benignos e 55 malignos.
Já o dataset GSE116196, continha 340 amostras, após o colapso de replicatas e remoção das amostras de pacientes do grupo de descoberta que também estavam no grupo validação, a quantidade de amostras e de pacientes reduziu para 136. A população era composta por 108 mulheres (79,4%) e 28 homens (20,6%). As amostras foram distribuídas no grupo de validação, com amostras indeterminadas (35; 10,3%), e no grupo de descoberta com amostras benignas (62; 18,2%) e malignas (39; 11,5%). A mediana de idade foi 45,5 anos, levemente inferior à observada no dataset GSE34289, sugerindo uma população ligeiramente mais jovem.
O dataset proveniente do TCGA-THCA, inicialmente continha 507 amostras, analogamente ao dataset anterior, foram removidas amostras de pacientes do grupo descoberta que também estavam no grupo validação, resultando em 490 amostras totais. Predominaram mulheres (358; 73,1%) em relação a homens (132; 26,9%), com mediana

de idade de 46 anos. Quanto ao tipo de amostra, 431 (87,9%) corresponderam a amostras malignas e 59 (12,1%) a amostras benignas.
Em todos os conjuntos, se observou a predominância de pacientes do sexo feminino, representando aproximadamente 73–79% da população estudada. A mediana de idade variou entre 45,5 e 51,5 anos, com população majoritariamente adulta. A proporção de lesões malignas variou de 11,5% no GSE116196, até 87,9% nas amostras provenientes do TCGA.

Investigação de biomarcadores

Após a etapa inicial de limpeza, padronização e preparação do dataset GSE116196, as 136 amostras foram submetidas ao processo de seleção de variáveis utilizando o algoritmo Boruta, por meio da biblioteca BorutaPy. Esse algoritmo, fundamentado no método de feature selection baseado em Random Forest, tem como objetivo identificar de forma robusta quais variáveis presentes na tabela de expressão possuem relevância para classificação. Apenas os preditores considerados estatisticamente importantes foram selecionados, resultando em um subconjunto composto por 10 miRNAs. Estes marcadores foram posteriormente direcionados para a etapa complementar de seleção final. O fluxograma das etapas da seleção de biomarcadores até o classificador final é descrito na Figura 1.

De maneira semelhante, o dataset GSE34289 foi submetido a um procedimento análogo de seleção de atributos, novamente utilizando o algoritmo Boruta como ferramenta central para a identificação de variáveis de maior relevância com fins de classificação. Esse processo resultou na filtragem de 17 mRNAs considerados estatisticamente significativos para a discriminação entre amostras malignas e controles saudáveis.

Na etapa subsequente, os 10 miRNAs derivados do GSE116196 e os 17 mRNAs selecionados a partir do GSE34289 foram combinados, originando um conjunto integrado de 27 genes candidatos [tabela 2]. Este conjunto foi aplicado ao dataset TCGA-THCA, no qual, adicionalmente, foram incorporados os dados clínicos referentes à idade e ao sexo dos pacientes. Com essas informações genômicas e clínicas, foi construído um modelo preditivo utilizando o algoritmo LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator), com o objetivo de realizar uma seleção mais criteriosa entre os 27 genes inicialmente identificados. Como resultado, o modelo apontou um subconjunto final de 6 genes, 3 miRNAs e 3 mRNAs que, em conjunto com as variáveis clínicas de idade e sexo, demonstraram o maior potencial para compor um painel diagnóstico de elevada acurácia (hsa-mir-1307, hsa-mir-138-1, hsa-mir-708, GABRB2, LRP1B, STK32A).

Desempenho do classificador

Com a finalidade de avaliar a aplicabilidade classificatória do conjunto final de variáveis selecionadas, foi desenvolvido um classificador baseado em regressão logística, um modelo estatístico robusto e amplamente utilizado em tarefas de predição binária. Para evitar vieses no processo de treinamento, o dataset foi devidamente dividido em subconjuntos de treinamento e validação, de forma a reduzir riscos de overfitting e permitir uma avaliação independente do desempenho do modelo. O desempenho do modelo foi descrito na Tabela 3.

A análise dos resultados evidenciou um desempenho global satisfatório [Figura 4]. O modelo apresentou acurácia de 97,28%, com intervalo de confiança de 95% variando entre 93,18% e 99,25%, demonstrando a consistência da predição. Outra métrica complementar corrobora a robustez do classificador. O índice Kappa, usado para avaliar a concordância entre valores preditos e observados além do esperado pelo acaso, atingiu 0,8791, valor que se enquadra na categoria de alta concordância.

No conjunto de validação, entre os 19 indivíduos pertencentes ao grupo controle saudável, o modelo classificou corretamente 17 casos, demonstrando 2 erros ao rotulá-los como cancerígenos (falsos positivos). Por outro lado, entre os 128 indivíduos com amostras malignas, 126 foram corretamente identificados, ocorrendo somente 2 classificações incorretas como benignas (falsos negativos). Em relação ao desempenho por classe, a sensibilidade foi de 98,44%, evidenciando alta capacidade do modelo em reconhecer casos positivos. A especificidade atingiu 89,47%, refletindo desempenho satisfatório na detecção dos casos negativos. Além disso, o valor preditivo positivo (PPV) alcançou 98,44%, enquanto o valor preditivo negativo (NPV) foi de 89,47%, confirmando a confiabilidade das classificações obtidas.

Por fim, o Balanced Accuracy, métrica que considera o desempenho equilibrado entre classes, apresentou valor de 93,96%, reforçando que o modelo não apresentou tendência a favorecer a classificação de uma das categorias em detrimento da outra. Tais resultados, em conjunto, evidenciam que o classificador desenvolvido apresenta desempenho preditivo elevado e potencial para ser considerado uma ferramenta de apoio ao diagnóstico clínico em cenários futuros.

Estudos prévios, como o ThyroSeq v3 e o Afirma, alcançaram valores preditivos negativos (VPN) próximos a 95%, mas especificidade próximo aos 80%, resultando em uma considerável taxa de falsos positivos e encaminhando pacientes para cirurgias desnecessárias. De forma semelhante, o ensaio baseado em miRNAs RosettaGX Reveal obteve boa sensibilidade, mas ainda com valor preditivo positivo (VPP) limitado. Já o teste mir-THYpe, validado em cenário brasileiro, representou um avanço ao reutilizar as mesmas lâminas de PAAF utilizadas na citologia, mas ainda apresenta restrições em termos de aplicabilidade ampla, devido ao custo elevado e centralização.

Este classificador de 6 genes diferencia-se ao combinar miRNAs e mRNAs em um único painel, explorando a complementaridade de diferentes classes de expressão gênica. A seleção de variáveis via Boruta seguida de refinamento por LASSO garantiu um modelo enxuto, composto por apenas seis genes, 3 miRNAs e 3 mRNAs, com potencial aplicabilidade clínica. Além disso, a inclusão de idade e sexo aprimorou a performance, refletindo a relevância dessas variáveis no câncer de tireoide.

Apesar desses achados promissores, este estudo apresenta limitações importantes. Primeiramente, os dados analisados são provenientes de bases públicas (GEO e TCGA), o que pode introduzir vieses relacionados à heterogeneidade de coleta, processamento e anotação clínica. Além disso, a análise retrospectiva restringe a extrapolação direta para a prática clínica, sendo necessária validação prospectiva em amostras de PAAF coletadas de forma padronizada e multicêntrica. Ademais, 87,9% das amostras no conjunto do TCGA corresponderam a tumores malignos, o que o distingue da prevalência encontrada na prática clínica. Outra limitação é devido ao fato que o conjunto do TCGA não possuía amostras de PAAF, mas amostras histopatológicas.

Futuras direções incluem a validação clínica do painel em diferentes populações, a estimativa de custo individual de cada exame e a incorporação de outros tipos de dados ômicos.

Próximos passos

A prospecção in silico dos biomarcadores mRNA e miRNA, que resultou no painel de seis genes aqui apresentado, corresponde à primeira etapa de um percurso mais amplo, já concluída, que agora segue para a bancada. O próximo movimento é confirmar experimentalmente esses achados: pretende-se medir a expressão dos genes selecionados em um conjunto piloto de 10 lâminas de PAAF do acervo do HUOL/UFRN — 5 de amostras malignas e 5 de benignas — verificando se o que se observou nos dados públicos se sustenta em bancada. Superada essa etapa, o passo seguinte é submeter o próprio teste diagnóstico à prova, por meio de um estudo longitudinal prospectivo em amostras de PAAF, comparando lado a lado o desempenho do classificador molecular, da citologia convencional e da biópsia, padrão-ouro histopatológico, em uma mesma coorte de pacientes com nódulos indeterminados. Essas duas etapas seguintes dependem da captação de financiamento específico, e o grupo de pesquisa já está em busca de fontes de fomento para viabilizá-las.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que a integração de miRNAs e mRNAs diferencialmente expressos em nódulos tireoidianos, somada a variáveis clínicas simples (idade e sexo), permitiu a construção de um classificador molecular com acurácia global de 97,28%, sensibilidade de 98,44% e especificidade de 89,47%. Esses resultados superam significativamente as taxas de desempenho relatadas por testes moleculares comerciais atualmente disponíveis, que apresentam elevado valor preditivo negativo, mas baixo valor preditivo positivo, sendo mais adequados como testes de exclusão do que de confirmação diagnóstica.

A elevada sensibilidade e o VPN obtidos reforçam a aplicabilidade do classificador como ferramenta para reduzir o número de cirurgias desnecessárias em pacientes com nódulos indeterminados, enquanto a boa especificidade e o VPP ampliam sua utilidade como teste confirmatório. Esse equilíbrio sugere aplicabilidade tanto em cenários de alta quanto de baixa prevalência da doença.

Portanto, os resultados sugerem que um painel integrado de miRNAs e mRNAs, aliado a variáveis clínicas simples, pode oferecer desempenho superior aos testes moleculares atuais, tanto como ferramenta de exclusão quanto de confirmação diagnóstica. Caso validado em estudos prospectivos, esse modelo poderá contribuir de forma significativa para o manejo mais preciso e menos invasivo de pacientes com nódulos tireoidianos indeterminados, reduzindo cirurgias desnecessárias e otimizando o cuidado em endocrinologia de precisão.

Referências

1 MU, C. et al. Mapping global epidemiology of thyroid nodules among general population: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in Oncology, v. 12, p. 1029926, 2022.

2 GRANI, G.; SPONZIELLO, M.; FILETTI, S.; DURANTE, C. Thyroid nodules: diagnosis and management. Nature Reviews Endocrinology, v. 19, p. 485-498, 2023. DOI: 10.1038/s41574-024-01025-4.

3 CHEN, D. W.; LANG, B. H. H.; MCLEOD, D. S. A.; NEWBOLD, K.; HAYMART, M. R. Thyroid cancer. The Lancet, v. 401, n. 10387, p. 1531–1544, 6 maio 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00020-X.

4 LAHA, D.; NILUBOL, N.; BOUFRAQECH, M. New therapies for advanced thyroid cancer. Frontiers in Endocrinology (Lausanne), v. 11, p. 82, 22 maio 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.00082.

5 BOUCAI, L.; ZAFEREO, M.; CABANILLAS, M. E. Thyroid cancer: a review. JAMA, v. 331, n. 5, p. 425–435, 2024. DOI: 10.1001/jama.2023.26348.

6 DURANTE, C.; GRANI, G.; LAMARTINA, L. et al. The diagnosis and management of thyroid nodules: a review. JAMA, v. 319, n. 9, p. 914-924, 2018. DOI: 10.1001/jama.2018.0898.

7 VIGNALI, P.; MACEROLA, E.; POMA, A. M.; SPARAVELLI, R.; BASOLO, F. Indeterminate thyroid nodules: from cytology to molecular testing. Diagnostics (Basel), v. 13, n. 18, p. 3008, 20 set. 2023. DOI: 10.3390/diagnostics13183008.

8 ALI, S. Z.; BALOCH, Z. W.; COCHAND-PRIOLLET, B.; SCHMITT, F. C.; VIELH, P.; VANDERLAAN, P. A. The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Thyroid, v. 33, n. 9, p. 1039-1044, set. 2023. DOI: 10.1089/thy.2023.0141.

9 SANTOS, M. T. D. et al. Molecular classification of thyroid nodules with indeterminate cytology: development and validation of a highly sensitive and specific new miRNA-based classifier test using fine-needle aspiration smear slides. Thyroid, v. 28, n. 12, p. 1618–1626, dez. 2018. DOI: 10.1089/thy.2018.0254.

10 SANTOS, M. T. et al. Clinical decision support analysis of a microRNA-based thyroid molecular classifier: a real-world, prospective and multicentre validation study. EBioMedicine, v. 82, p. 104137, ago. 2022. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104137.

11 NIKIFOROVA, M. N. et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. Cancer, v. 124, n. 8, p. 1682–1690, 15 abr. 2018. DOI: 10.1002/cncr.31245.

12 GONZÁLEZ, H. E. et al. A 10-gene classifier for indeterminate thyroid nodules: development and multicenter accuracy study. Thyroid, v. 27, n. 8, 2017. DOI: 10.1089/thy.2017.0067.

13 SÖNMEZ, G.; ÜNLÜTÜRK, U. A systematic review of emerging RNA markers in thyroid fine needle aspiration cytology samples: advancements and challenges. Endocrine, v. 89, n. 2, p. 365–379, ago. 2025. DOI: 10.1007/s12020-025-04266-z.

14 ZHAO, Y. et al. The combined use of miRNAs and mRNAs as biomarkers for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. International Journal of Molecular Medicine, v. 36, n. 4, p. 1097–1103, out. 2015. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2305.
MACVANIN, M. T. et al. New biomarkers: prospect for diagnosis and monitoring of thyroid disease. Frontiers in Endocrinology (Lausanne), v. 14, p. 1218320, 21 jul. 2023. DOI: 10.3389/fendo.2023.1218320.

15 ESZLINGER, M.; LAU, L.; GHAZNAVI, S. et al. Molecular profiling of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology. Nature Reviews Endocrinology, v. 13, p. 415–424, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2017.24.

16 MAZEH, H. et al. Next-generation sequencing identifies a highly accurate miRNA panel that distinguishes well-differentiated thyroid cancer from benign thyroid nodules. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, v. 27, n. 8, p. 858–863, ago. 2018. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0055.

17 GHANEM, M.; LEVY, Y.; MAZEH, H. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with intermediate cytology. Gland Surgery, v. 1, n. 2, p. 89–91, ago. 2012. DOI: 10.3978/j.issn.2227-684X.2012.08.05.

18 MACVANIN, M. T. et al. New biomarkers: prospect for diagnosis and monitoring of thyroid disease. Frontiers in Endocrinology (Lausanne), v. 14, p. 1218320, 21 jul. 2023. DOI: 10.3389/fendo.2023.1218320.

19 ZAFEREO, M. et al. A thyroid genetic classifier correctly predicts benign nodules with indeterminate cytology: two independent, multicenter, prospective validation trials. Thyroid, v. 30, n. 5, p. 704–712, maio 2020. DOI: 10.1089/thy.2019.0490.

Anexos



Tabela 1 - Epidemiologia dos Datasets de Nódulos Tireoidianos



Tabela 2 - Lista de mRNAs e miRNAs.



Tabela 3 - Métricas de desempenho do modelo



Figura 1 -Fluxograma das etapas de seleção de variáveis e construção do classificador molecular

CÓDIGO: SB0512

AUTOR: ANDRE FELIPE DA SILVA LIMA

COAUTOR: ANDREIA FERREIRA NERY

ORIENTADOR: RAFAEL WESLEY BASTOS

TÍTULO: Enfrentando a esporotricose endêmica no contexto de uma Saúde Única: análise das relações entre saúde humana, animal e ambiental entre participantes de ações interativas no Rio Grande do Norte

Resumo

A esporotricose é uma infecção fúngica que se consolidou no Brasil como zoonose de transmissão predominantemente felina, cuja compreensão exige integrar as dimensões humana, animal e ambiental. Assim, o objetivo desse projeto foi analisar as características da relação com animais e as condições ambientais e territoriais declaradas por participantes de ações formativas realizadas nas oito Regiões de Saúde do Rio Grande do Norte. Estudo quantitativo, descritivo e analítico, contou com 738 respostas do momento pré-formação, analisadas por estatística descritiva, qui-quadrado de Pearson e coeficiente V de Cramer. A maioria declarou possuir animais no domicílio, com predomínio de cães e gatos, e o contato direto superou o indireto e a ausência de contato, sendo o manuseio o tipo mais citado. Entre os que não buscam atendimento veterinário diante de animal com ferida suspeita, predominou o custo. Embora as condições de infraestrutura fossem majoritariamente favoráveis, 80,5% relataram muitos animais soltos na vizinhança. A compreensão da transmissão do gato ao ser humano alcançou 91,3%, mas o reconhecimento de sinais no animal ficou em 70,5% e saber destinar corretamente cadáveres, em 32,4%. As associações exploratórias foram significativas, porém de magnitude fraca (V entre 0,129 e 0,252). Conclui-se que a adesão conceitual à Saúde Única é ampla, enquanto as competências operacionais permanecem frágeis, o que delimita prioridades para a educação permanente e a vigilância.

Palavras-chave: Esporotricose. Saúde Única. Zoonoses. Educação em Saúde. Vigilância.

TITLE: Endemic Sporotrichosis in the Context of One Health: An Analysis of the Relationships Between Human, Animal, and Environmental Health Among Participants in Interactive Actions in Rio Grande do Norte

Abstract

Sporotrichosis is a fungal infection that has become established in Brazil as a zoonosis transmitted mainly by cats, and understanding it requires integrating human, animal and environmental dimensions. This project therefore aimed to analyse the characteristics of participants' relationship with animals and the environmental and territorial conditions they reported, in training activities carried out across the eight Health Regions of Rio Grande do Norte. This quantitative, descriptive and analytical study used 738 pre-training responses, analysed through descriptive statistics, Pearson's chi-square test and Cramer's V coefficient. Most participants reported keeping animals at home, mainly dogs and cats, and direct contact exceeded indirect contact and no contact, with handling as the most cited type. Among those not seeking veterinary care for animals with suspicious wounds, cost predominated. Although infrastructure conditions were mostly favourable, 80.5% reported many free-roaming animals nearby. Understanding of cat-to-human transmission reached 91.3%, whereas recognition of signs in animals reached 70.5% and knowing how to properly dispose of carcasses only 32.4%. Exploratory associations were significant but weak in magnitude (V between 0.129 and 0.252). Conceptual adherence to One Health is broad, while operational competencies remain fragile, which delimits priorities for continuing education and health surveillance.

Keywords: Sporotrichosis. One Health. Zoonoses. Health Education. Surveillance.

Introdução

A esporotricose é uma micose causada por fungos do gênero *Sporothrix*, sendo historicamente associada ao contato ocupacional com solo e matéria vegetal, afetando especialmente trabalhadores rurais e jardineiros. Entretanto, na América do Sul, a emergência de *S. brasiliensis* modificou esse cenário, com a transmissão passando a ocorrer predominantemente por animais infectados, especialmente gatos domésticos. (Rossow *et al*., 2020; Rosa; Quaresma, 2025). A forma de infecção mais comum ocorre quando os animais inoculam o fungo na pele do ser humano por meio de mordedura e arranhadura. Dessa forma, a esporotricose é um agravo compreendido somente quando as dimensões humana, animal e ambiental são examinadas e integradas em conjunto. (OMS, 2022).

No Rio Grande do Norte, o primeiro caso humano foi diagnosticado em 2016 e desde então observa-se ascensão das ocorrências, concentradas na capital e em sua região metropolitana, nas zonas de menores índices de desenvolvimento socioeconômico, com transmissão relacionada ao contato com gatos independentemente da presença de lesões no animal e predomínio de ocupações domésticas ou peri domésticas (Milan *et al*., 2023; Higashi *et al*., 2025). O estado registrou ainda desfecho fatal por forma pulmonar em paciente imunocompetente, exposto pela convivência com gatos errantes (Alves *et al*., 2020).

O papel dos felinos é central na transmissão da esporotricose no Brasil. Um mesmo fungo é capaz de circular entre gatos e humanos de um mesmo domicílio (Berber-Freitas *et al.*, 2026), mantendo o ciclo da doença. A circulação depende, assim, tanto de práticas humanas de convivência com animais quanto das condições do território, como a presença de animais sem supervisão, o manejo de resíduos e carcaças e as barreiras de

acesso à assistência veterinária, cuja identificação em nível local, com engajamento comunitário, é condição essencial para respostas efetivas (Jeleff *et al.*, 2022).

Nesse marco situa-se a perspectiva da Saúde Única, entendida não apenas como arranjo de coordenação institucional, mas como modo relacional e situado de conhecer a saúde (Afonso; Fernandes, 2026), cuja implementação no Brasil esbarra em fragmentação institucional, escassez de políticas intersetoriais e insuficiência de formação profissional (Gregório *et al*., 2025). Se a transmissão ocorre no cotidiano domiciliar e peridomiciliar, a vigilância, a educação em saúde e a educação permanente tornam-se decisivas, e os profissionais de saúde, de vigilância e de assistência veterinária constituem a interface prática entre a doença e a resposta organizada (Guzmán *et al.*, 2021; Motta *et al.*, 2025).

Nesse paradigma, embora a literatura descreva com detalhes o perfil clínico e a distribuição dos casos, é escassa a caracterização das relações concretas que os participantes de ações formativas mantêm com os animais e das condições ambientais de seus domicílios, dimensões que antecedem a exposição. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é analisar as características da relação com animais e as condições ambientais e territoriais declaradas pelos participantes das ações formativas sobre esporotricose realizadas nas oito Regiões de Saúde do Rio Grande do Norte, examinando de modo exploratório suas associações com conhecimentos e percepções sobre a doença, sob a perspectiva da Saúde Única.

Metodologia

Trata-se de um estudo quantitativo, de caráter descritivo e analítico, desenvolvido no âmbito do projeto “Enfrentando a esporotricose endêmica no contexto de uma Saúde Única”, que adota uma abordagem participativa e intervencionista, articulando ações de vigilância, assistência e educação permanente para o enfrentamento da esporotricose no estado do Rio Grande do Norte.

As ações foram desenvolvidas nas oito regiões de saúde do estado (Litoral Sul/Agreste, Oeste, Mato Grande/Salineira, Seridó, Trairi/Potengi, Alto Oeste, Metropolitana e Vale do Açu) por meio da realização de formações voltadas a profissionais de saúde e outros atores envolvidos no enfrentamento da esporotricose. Ao todo, 925 pessoas participaram das atividades formativas realizadas no período analisado.

A população do estudo compreendeu os participantes das ações de formação desenvolvidas pelo projeto, incluindo profissionais de saúde e outros atores relacionados ao enfrentamento da esporotricose. Foram incluídos nas análises os participantes que aderiram voluntariamente à pesquisa, aceitaram participar mediante consentimento e responderam ao instrumento de coleta de dados. Foram excluídos os registros que não correspondiam à etapa analisada.

Para a coleta de dados, foi aplicado um formulário semiestruturado contendo questões destinadas à caracterização dos participantes, bem como à investigação de

conhecimentos, percepções e aspectos relacionados à esporotricose e ao seu enfrentamento. As questões de percepção e concordância foram estruturadas em escala de Likert de cinco pontos, variando entre os níveis de discordância e concordância totais. Foram obtidas 777 respostas ao instrumento. Entretanto, para as análises apresentadas neste relatório, foram consideradas exclusivamente as respostas referentes ao momento pré-formação, uma vez que a etapa de coleta e avaliação dos dados pós-formação ainda se encontra em andamento.

As análises desenvolvidas no âmbito deste plano de trabalho concentraram-se principalmente nas variáveis relacionadas às condições ambientais e à relação dos participantes com os animais, incluindo aspectos referentes ao ambiente de residência e à presença, convivência e contato com animais. Essas variáveis foram analisadas em conjunto com características dos participantes e informações relacionadas aos seus conhecimentos e percepções sobre a esporotricose, buscando identificar possíveis padrões e associações relevantes para a compreensão do contexto socioambiental relacionado ao enfrentamento da doença.

Os dados foram organizados em banco de dados e submetidos inicialmente à análise descritiva, mediante apresentação de frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas. Adicionalmente, foram realizadas análises exploratórias de associação entre as variáveis por meio do teste do qui-quadrado de Pearson, adotando-se nível de significância de 5% ($p<0,05$). A magnitude das associações identificadas foi avaliada pelo coeficiente V de Cramer.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), sob o CAAE nº 89163825.0.0000.5292, sendo conduzida em conformidade com as normas éticas aplicáveis às pesquisas envolvendo seres humanos. A participação ocorreu de forma voluntária, mediante consentimento dos participantes, assegurando-se o sigilo e a confidencialidade das informações. Os dados foram organizados e analisados de forma anonimizada, sendo utilizados exclusivamente para fins científicos.

Dessa forma, as análises apresentadas neste relatório correspondem a uma avaliação inicial dos dados obtidos antes da realização das formações, com ênfase nas relações entre aspectos ambientais, convivência com animais e outras características investigadas. Os dados referentes à etapa pós-formação serão posteriormente incorporados ao estudo, permitindo uma avaliação complementar dos efeitos das atividades educativas desenvolvidas pelo projeto.

Resultados e Discussões

Caracterização dos participantes

Foram analisadas as respostas de 738 participantes referentes ao momento pré-formação. Entre eles, houve predomínio de mulheres, que representaram 55,0% (406/738) do total, ante 41,1% (303/738) de homens, além de 0,4% (3/738) de pessoas não binárias e 3,5%

(26/738) que não informaram. A distribuição etária concentrou-se nas faixas de 30 a 39 anos, com 29,9% (221/738), e de 18 a 29 anos, com 28,0% (207/738), seguidas pelas faixas de 40 a 49 anos, com 21,8% (161/738). Quanto à raça ou cor autodeclarada, as categorias parda, com 45,7% (337/738), e branca, com 45,0% (332/738), reuniram proporções semelhantes e majoritárias, seguidas pela categoria preta, com 7,2% (53/738), enquanto as categorias amarela, com 0,4% (3/738), e indígena, com 0,3% (2/738), foram residuais e 1,5% (11/738) preferiram não responder (Figura 1).

No que se refere à ocupação, variável de resposta múltipla, predominaram os participantes vinculados à saúde humana em atividades assistenciais, com 38,1% (281/738), seguidos por aqueles atuantes em vigilância em saúde e endemias, com 28,0% (207/738), e por profissionais da educação, pesquisa e formação, com 20,2% (149/738); a participação de profissionais da saúde animal e da medicina veterinária foi minoritária, alcançando 8,9% (66/738), assim como as categorias de serviços, comércio e trabalho de cuidado, com 3,0% (22/738), gestão e serviço público, com 2,7% (20/738), outras ocupações, com 2,0% (15/738), e agricultura e trabalho rural, com 0,4% (3/738) (Figura 1). Esses participantes declararam residência em 74,4% (131/176) dos municípios do Rio Grande do Norte, distribuídos pelas oito Regiões de Saúde do estado, incluindo os municípios-sede das regionais, ainda que sem cobertura municipal completa (Figura 2).

Relação com os animais e conduta diante de ferida suspeita

Quanto à relação com os animais, 58,5% (432/738) declararam possuir animais no domicílio, enquanto 41,5% (306/738) informaram não possuir. Entre os 432 participantes que possuíam animais, predominou a posse de um a dois animais, com 60,8% (263/432), seguida pelas faixas de três a cinco, com 23,1% (100/432), de seis a dez, com 8,5% (37/432), e de mais de dez, com 5,3% (23/432), além de 2,1% (9/432) que não informaram a quantidade. Nesses mesmos domicílios, e considerando que mais de uma espécie podia ser declarada, os cães foram os animais mais frequentes, presentes em 70,6% (305/432), seguidos pelos gatos, em 50,5% (218/432). As demais espécies apareceram em proporções progressivamente menores: aves, em 14,6% (63/432), animais de produção, em 10,6% (46/432), animais aquáticos e anfíbios e répteis, ambos em 2,5% (11/432), pequenos mamíferos, em 2,1% (9/432), e aracnídeos, em 0,2% (1/432) (Figura 3).

A convivência declarada, contudo, não se restringiu à posse domiciliar. Considerando todos os participantes, o contato direto com animais foi a condição mais frequente, referida por 55,1% (407/738), seguida pelo contato indireto, relatado por 24,9% (184/738), e pela ausência de contato, informada por 19,9% (147/738). Entre os 407 participantes com contato direto, admitida mais de uma resposta, o manuseio foi o tipo mais citado, com 45,0% (278/617), seguido pela alimentação, com 25,1% (155/617), e pelo cuidado, com 24,1% (149/617), que apresentaram frequências próximas entre si, e, por último, pelo resgate de animais, com 5,7% (35/617) (Figura 3).

Ainda no que diz respeito à relação com os animais, foi investigada a conduta diante de animal com ferida suspeita. A busca sistemática por atendimento veterinário foi a resposta mais frequente, declarada por 53,1% (392/738), seguida pela busca eventual, com 22,4% (165/738), pela ausência de busca, com 15,5% (114/738), e pela busca ocasional, com 9,0% (67/738). Entre os 114 participantes que declararam não buscar atendimento, o custo ou a inacessibilidade do serviço foi o motivo predominante, referido por 90,4%

(103/114), sendo minoritárias as justificativas relacionadas à percepção de desnecessidade ou à desresponsabilização, com 9,6% (11/114) (Figura 3).

Condições ambientais e de infraestrutura

Além da relação com os animais, foram investigadas as condições ambientais dos domicílios. O destino dos resíduos concentrou-se na coleta regular realizada pela prefeitura, referida por 86,6% (639/738), seguida, em proporções muito menores, pelo descarte em caçamba ou ponto comunitário, com 6,6% (49/738), pela queima ou enterro do lixo, com 2,8% (21/738), por outros destinos ou informação não fornecida, com 2,3% (17/738), pela coleta regular por outro prestador, com 1,1% (8/738), e pelo descarte inadequado a céu aberto, com 0,5% (4/738). Quanto à pavimentação, 82,9% (612/738) residiam em vias pavimentadas, das quais 70,4% (431/612) foram classificadas como em bom estado e 29,6% (181/612) como deterioradas, enquanto 9,5% (70/738) relataram vias sem pavimentação e 7,6% (56/738), vias parcialmente pavimentadas. A oferta de água, por sua vez, foi considerada regular por 94,2% (695/738), sendo residuais os relatos de irregularidade, com 3,9% (29/738), e de situação não determinada, com 1,9% (14/738). O abastecimento, variável de resposta múltipla, deu-se majoritariamente por rede pública, referida por 94,0% (694/738), com participação bem menor de poço ou cacimba, com 6,5% (48/738), carro-pipa, com 1,8% (13/738), e água da chuva, com 0,1% (1/738) (Figura 4).

Conhecimentos, percepções e práticas

Em relação às percepções dos participantes, os indicadores de maior concordância foram a compreensão da transmissão do gato para o ser humano, com 91,3% (674/738), e o reconhecimento da necessidade de separar animais doentes dos saudáveis, com 90,9% (671/738), seguidos pelo conhecimento dos cuidados com os demais animais quando há gato com esporotricose, com 86,3% (637/738), e pela adoção de medidas preventivas ao lidar com animais doentes ou feridos, com 85,6% (632/738). Os menores percentuais de concordância recaíram sobre o reconhecimento da esporotricose como zoonose, com 78,6% (580/738), e, sobretudo, sobre o reconhecimento dos sinais da doença em animais, com 70,5% (520/738), item que também concentrou as maiores proporções de neutralidade, com 16,9% (125/738), e de discordância, com 12,6% (93/738) (Tabela 1).

Se o conhecimento sobre a doença mostrou-se elevado nos aspectos conceituais, o mesmo padrão repetiu-se nas percepções sobre Saúde Única. A concordância foi muito elevada quanto à contribuição da relação entre saúde humana, animal e ambiental para a prevenção de doenças, com 95,4% (704/738), quanto ao papel da integração entre serviços no controle da esporotricose, com 94,9% (700/738), e quanto à importância do próprio conceito de Saúde Única, com 89,2% (658/738). Em contraste com essa adesão conceitual, apenas 60,3% (445/738) declararam já ter tido contato com ações de Saúde Única e somente 44,0% (325/738) concordaram que existe comunicação entre os setores em sua região, indicador que reuniu as maiores proporções de discordância, com 27,9% (206/738), e de neutralidade, com 28,0% (207/738), de toda a tabela (Tabela 2).

Esse contraste entre adesão conceitual e experiência concreta acentuou-se nos indicadores de acesso e vigilância. A percepção de facilidade de acesso a serviços veterinários dividiu os participantes, com 43,4% (320/738) de concordância e 34,8% (257/738) de discordância, assim como saber encaminhar casos suspeitos em animais, com 45,7%

(337/738) e 34,1% (252/738), respectivamente. Os indicadores relativos à notificação apresentaram o padrão mais desfavorável do conjunto: 50,1% (370/738) discordaram de conhecer o fluxo de notificação de casos animais, ante apenas 25,9% (191/738) de concordância, e 45,9% (339/738) discordaram de dispor de canais adequados para essa notificação, ante 29,1% (215/738). Coerentemente com esse quadro, 56,9% (420/738) concordaram que existem desafios para a notificação no território (Tabela 3).

No que se refere ao ambiente, ao manejo animal e às vulnerabilidades territoriais, registraram-se concordâncias elevadas quanto ao reconhecimento de condições territoriais que favorecem o adoecimento, com 81,6% (602/738), à presença de muitos animais soltos na vizinhança, com 80,5% (594/738), e à percepção de preconceito contra animais com esporotricose, com 79,0% (583/738). O reconhecimento do risco de enterrar animal doente alcançou 64,4% (475/738) e a percepção de que a falta de infraestrutura afeta a saúde, 53,8% (397/738). O pior desempenho de toda a tabela, contudo, coube ao item saber destinar corretamente o cadáver de animal com esporotricose, com 47,7% (352/738) de discordância e apenas 32,4% (239/738) de concordância. Registre-se ainda que 45,9% (339/738) discordaram da afirmação de que a condição social pode dificultar o acesso veterinário, ante 34,0% (251/738) de concordância (Tabela 4).

Análises exploratórias de associação

O reconhecimento de sinais da esporotricose animal associou-se ao nível de contato com animais, com concordância de 77,6% (316/407) entre os participantes com contato direto, 62,5% (115/184) entre os de contato indireto e 60,5% (89/147) entre os sem contato ($\chi^2(4) = 24,60$; $p < 0,0001$; $V = 0,129$), e também à exposição ocupacional a animais, com 73,7% (202/274) de concordância entre os expostos e 68,5% (318/464) entre os não expostos ($\chi^2(2) = 15,22$; $p = 0,0005$; $V = 0,144$). Em ambos os casos, os valores do coeficiente V de Cramer indicam magnitude fraca (Tabela 5). A exposição ocupacional associou-se, ainda, a saber encaminhar casos suspeitos, com 54,7% (150/274) de concordância entre os expostos e 40,3% (187/464) entre os não expostos ($\chi^2(2) = 26,09$; $p < 0,0001$; $V = 0,188$), a conhecer os cuidados com outros animais, com 92,0% (252/274) e 83,0% (385/464), respectivamente ($\chi^2(2) = 20,25$; $p < 0,0001$; $V = 0,166$), e a saber destinar corretamente o cadáver, com 38,7% (106/274) e 28,7% (133/464) ($\chi^2(2) = 30,74$; $p < 0,0001$; $V = 0,204$), com magnitudes que permaneceram na faixa fraca, ainda que superiores às anteriores (Tabela 6). Já o contato prévio com ações de Saúde Única associou-se ao conhecimento dos cuidados com outros animais, referido por 92,1% (410/445) dos que já haviam tido esse contato, 80,1% (133/166) dos neutros e 74,0% (94/127) dos que não haviam tido ($\chi^2(4) = 40,31$; $p < 0,0001$; $V = 0,165$), e, com a maior magnitude de todo o conjunto analisado, a saber encaminhar casos suspeitos, com 57,1% (254/445), 31,3% (52/166) e 24,4% (31/127), respectivamente ($\chi^2(4) = 93,66$; $p < 0,0001$; $V = 0,252$), valor que ainda assim permanece no limite entre fraca e moderada (Tabela 7).

Discussão

Os achados descrevem participantes que convivem intensamente com animais e residem, em sua maioria, em infraestrutura urbana consolidada, mas reconhecem o próprio território como produtor de risco. Sob a perspectiva de Saúde Única, a exposição à esporotricose não decorre isoladamente do animal, do comportamento humano ou do ambiente, mas do modo como se articulam no cotidiano domiciliar e peridomiciliar.

A predominância do contato direto e a alta posse domiciliar, com cães e gatos nas duas primeiras posições, situam o grupo no interior da cadeia de transmissão do *S. brasiliensis*, cujos hospedeiros centrais são os felinos (Rossow *et al.*, 2020; Rosa; Quaresma, 2025). É relevante, porém, que os cães tenham sido a espécie mais declarada: embora a transmissão zoonótica por cães ainda não esteja bem estabelecida, animais infectados podem contribuir para a contaminação do ambiente e para exposições indiretas. Evidências recentes demonstram que o fungo permanece viável em superfícies inanimadas por até 25 dias, indicando possibilidade de transmissão por fômites (Cognialli *et al.*, 2025). O predomínio de contatos cotidianos, como manuseio, alimentação e cuidado, torna-se assim relevante, pois tais práticas envolvem materiais potencialmente contaminados por exsudatos. Ainda que essa via necessite de confirmação epidemiológica, reforça medidas preventivas que contemplem a higienização de objetos usados no manejo animal.

O reconhecimento de sinais da doença em animais foi o indicador de pior desempenho, em contraste com a compreensão quase universal da rota de transmissão. Há descompasso entre saber que a doença é transmissível e conseguir identificá-la no animal, etapa decisiva para interromper a cadeia, o que é coerente com a observação de que o desconhecimento dessa dinâmica dificulta políticas de contenção (Oliveira *et al.*, 2024) e com a expansão da epidemia sem consenso nacional (Orofino-Costa *et al.*, 2022). Esse reconhecimento associou-se ao nível de contato e à exposição ocupacional, mas com baixa magnitude: a experiência prática, isoladamente, explica pouco da variação observada. Não cabe inferência causal, mas há implicação formativa direta, pois presumir que quem convive com animais sabe identificar sinais suspeitos não encontra sustentação.

Esse padrão se refina nas demais associações. A exposição ocupacional relacionou-se ao encaminhamento de casos, aos cuidados com outros animais e à destinação de cadáveres, com magnitudes ligeiramente superiores mas ainda fracas, enquanto o contato prévio com ações de Saúde Única alcançou a maior magnitude do conjunto no encaminhamento de casos suspeitos. Ainda que o desenho não permita atribuir a essas ações o conhecimento observado, a diferença ligada a ações estruturadas foi mais expressiva que a ligada à convivência cotidiana ou à exposição ocupacional, o que dialoga com a proposição de que a Saúde Única constitui um modo de conhecer, e não apenas um arranjo de coordenação (Afonso; Fernandes, 2026), e com o argumento de que a formação profissional é um dos principais gargalos de sua implementação no Brasil (Gregório *et al.*, 2025).

Esse conjunto de associações fracas convive com adesão conceitual praticamente unânime. Mais de 94% concordaram que a relação entre as três dimensões ajuda a prevenir doenças e que a integração entre serviços contribui para o controle da doença, mas apenas 60,3% relataram contato prévio com ações de Saúde Única e somente 44,0% reconheceram existir comunicação entre os setores em sua região. A distância entre a legitimidade do conceito e a experiência concreta de integração é o achado mais eloquente quanto à governança, compatível com a fragmentação institucional descrita no país (Gregório *et al.*, 2025), com redes que operam com sobreposição de esforços e monitoramento insuficiente (Khan *et al.*, 2018) e com instrumentos de avaliação que raramente integram governança, saúde ambiental e uso de evidências (El-Jardali *et al.*, 2026). O plano conjunto de ação das organizações internacionais propõe superar essa fragmentação por arranjos compartilhados (FAO, 2022), que a maioria não percebe como existentes em seu território.

Os indicadores de vigilância sustentam essa leitura: metade discordou de conhecer o fluxo de notificação de casos animais e quase metade, de dispor de canais adequados, enquanto a maioria reconhece desafios para notificar. Como a contenção depende de que alguém identifique e encaminhe o caso, a lacuna afeta diretamente a capacidade de resposta. Os profissionais da saúde animal foram minoria, predominando os da assistência à saúde humana e da vigilância: o público majoritário tende a ter notícia do caso humano primeiro, mas declara não dominar os fluxos do componente animal. A experiência paranaense, em que um gato atendido em clínica veterinária escola levou à identificação de lesões no tutor e à confirmação de quinze casos felinos, ilustra o rendimento dessa comunicação (Motta *et al.*, 2025).

O acesso à assistência veterinária articula com nitidez as três dimensões. Embora pouco mais da metade declare buscar sempre atendimento diante de animal com ferida suspeita, as barreiras de custo, ausência de serviço ou de transporte foram citadas por 170 participantes (23,0%), mais de quinze vezes a proporção que alegou desnecessidade ou não assunção da responsabilidade. O obstáculo predominante não é atitudinal, e sim estrutural. Um animal com lesão que não chega ao serviço permanece como fonte de exposição no domicílio e na vizinhança, de modo que a barreira econômica converte-se, por via indireta, em risco para a saúde humana, o que converge com a concentração dos casos em centros urbanos de menores recursos (Oliveira *et al.*, 2024) e, no estado, nas zonas de menor desenvolvimento socioeconômico (Milan *et al.*, 2023; Higashi *et al.*, 2025).

Chama atenção, contudo, uma tensão interna: enquanto as barreiras econômicas dominaram as justificativas concretas, 45,9% discordaram de que a condição social possa dificultar o acesso veterinário. Uma hipótese que os dados não permitem testar é a de que o obstáculo econômico seja mais facilmente reconhecido como circunstância imediata do que como determinação social do acesso, o que indicaria alvo específico para a educação permanente, coerente com a proposição de que identificar vulnerabilidades locais com participação da comunidade é elemento constitutivo da resposta (Jeleff *et al.*, 2022) e com a leitura que situa acesso ao cuidado e ambiente saudável como dimensões indissociáveis (Abud; Gorisch; Souza, 2025).

As condições ambientais compõem quadro heterogêneo. O predomínio da coleta regular de resíduos, das vias pavimentadas e da água de rede pública sugere infraestrutura consolidada, o que não significa ausência de risco: quase 30% das vias pavimentadas apresentavam buracos, indicando gradiente de qualidade dentro de uma mesma categoria formal. Ademais, a grande maioria concordou que há muitos animais soltos na vizinhança e reconheceu condições territoriais que favorecem o adoecimento. O trânsito de animais sem supervisão amplia o contato entre infectados e suscetíveis (Rossow *et al.*, 2020; Motta *et al.*, 2025), de modo que a infraestrutura não neutraliza o risco quando o manejo populacional animal permanece frágil.

O manejo de carcaças ilustra o ponto, pois saber destinar corretamente o cadáver foi o item de pior pontuação, embora 64,4% reconhecessem o risco de enterrar o animal doente. Reconhecer o risco e saber agir são competências distintas, e essa lacuna pode ser trabalhada por capacitações que, na perspectiva da Saúde Única, integram proteção humana, cuidado animal e redução de risco ambiental em uma mesma conduta. Já a percepção de preconceito contra animais com esporotricose, referida por 79% , acrescenta camada social indissociável da resposta, pois o estigma pode induzir à ocultação de casos,

ao abandono de animais doentes e à resistência à notificação. Somada às barreiras econômicas e ao desconhecimento dos fluxos, caracteriza a subdetecção como encadeamento de fatores, e não causa única. Cabe considerar ainda que as rotas de exposição não se limitam ao ambiente urbano doméstico (Rodrigues *et al.*, 2024), devendo contextos rurais e de contato com fauna silvestre entrar nas ações territorializadas.

A leitura conjunta sugere agenda formativa delimitada: os conteúdos conceituais têm adesão elevada, enquanto as lacunas se concentram nas competências operacionais, o que é consistente com propostas de estruturar formações a partir das competências exigidas pela prática (Guzmán *et al.*, 2021) e com a Saúde Única como abordagem que exige tradução operacional (Fang *et al*., 2026).

Algumas limitações devem ser consideradas. Os participantes não constituem amostra probabilística, mas grupo que aderiu voluntariamente às ações, o que restringe a generalização, e as informações são autorreferidas, sujeitas a viés de desejabilidade social nos itens de conhecimentos e práticas preventivas. As análises de associação foram exploratórias e transversais, não permitindo estabelecer causalidade, e as magnitudes foram fracas. Por fim, os dados correspondem ao momento pré-formação e a etapa pós-formação segue em andamento, não sendo possível avaliar mudanças no conhecimento nem atribuir às formações os resultados observados.

Conclusão

Este trabalho analisou a relação com animais e as condições ambientais e territoriais declaradas pelos participantes das ações de formação nas oito Regiões de Saúde do Rio Grande do Norte, no momento anterior às formações. A principal contribuição está em demonstrar que a adesão conceitual à Saúde Única e o entendimento da natureza zoonótica da esporotricose são amplos, enquanto as competências operacionais que sustentam a interrupção da cadeia de transmissão permanecem frágeis. O desafio formativo não é, portanto, de convencimento quanto ao valor da abordagem integrada, mas de sua tradução em condutas verificáveis no cotidiano dos serviços e dos territórios.

Para a educação e a comunicação em saúde, os achados sugerem priorizar o reconhecimento de sinais em animais e as práticas rotineiras de contato. Para a educação permanente, indicam qualificar os profissionais da assistência e da vigilância nos aspectos do componente animal e explicitar o vínculo entre determinantes sociais e possibilidade concreta de cuidado veterinário. Para a vigilância, evidenciam a urgência de tornar conhecidos e acessíveis os fluxos de notificação de casos animais. A distância entre o reconhecimento quase unânime do valor da integração entre serviços de saúde humana e animal e a baixa percepção de comunicação efetiva aponta para a necessidade de arranjos operacionais concretos, e não de convergência apenas discursiva, enquanto o predomínio do custo como motivo para a não busca de atendimento indica que ampliar o acesso, inclusive por serviços públicos em territórios vulneráveis, protege também a saúde humana.

Ressalva-se tratar-se de estudo transversal, com adesão voluntária, cujas associações são exploratórias, não permitindo inferência de causalidade nem generalização para a população do estado. Como os dados referem-se exclusivamente ao momento pré-formação, constituem caracterização de linha de base, cabendo à etapa em andamento examinar eventuais mudanças associadas às atividades educativas. Recomenda-se que pesquisas futuras aprofundem as barreiras de acesso à assistência veterinária e o estigma associado a animais doentes.

Referências

ABUD, C. O.; GORISCH, P.; SOUZA, L P. Saúde Única: pilar integrativo dos direitos humanos à saúde e ao meio ambiente. **Ciência ET Praxis**, [*S.l.*], v. 20, n. 35, p. 230-242, 2025. DOI: 10.36704/cipraxis.v20i35.9266.

AFONSO, J.; FERNANDES, J. B. One Health: an epistemological genealogy. **One Health**, [*S.l.*], v. 23, n. 1, 2026. DOI: 10.1016/j.onehlt.2026.101524.

ALVES, M M. *et al.* Fatal pulmonary sporotrichosis caused by Sporothrix brasiliensis in Northeast Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [*S.l.*], v. 14, n. 5, p. e0008141, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008141.

AMADEI, S. S. *et al.* Molecular detection of medically relevant Sporothrix species in roadkilled wildlife in the Brazilian Atlantic forest. **Mycopathologia**, [*S.l.*], v. 191, n. 2, 2026. DOI: 10.1007/s11046-026-01067-4.

BERBER-FREITAS, B. B. *et al.* Cat-transmitted sporotrichosis: a clonal household outbreak with atypical human and canine disease due to Sporothrix brasiliensis. **Mycopathologia**, [*S.l.*], v. 191, n. 3, 2026. DOI: 10.1007/s11046-026-01075-4.

COGNIALLI, R, C. R. *et al*. New insights on transmission of Sporothrix brasiliensis. **Mycoses**, [*S.l.*], v. 68, n. 3, p. e70047, 2025. DOI: 10.1111/myc.70047.

EL-JARDALI, F. *et al.* Strengthening One Health systems: a readiness assessment across Croatia, Ghana and Nigeria. **One Health**, [*S.l.*], v. 23, n. 1, 2026. DOI: 10.1016/j.onehlt.2026.101533.

FANG, X. **et al.** One Health: past, present, and future toward an integrated global health framework across humans, animals, and the environment. **Microbiome and One Health**, [*S.l.*], v. 1, p. 100004, 2026. DOI: 10.1016/j.micoh.2026.100004.

FAO; UNEP; WHO; WOAH. **One Health Joint Plan of Action, 2022-2026**: working together for the health of humans, animals, plants and the environment. Roma: FAO, 2022. DOI: 10.4060/cc2289en.

GREGÓRIO, H. B. *et al.* A interdependência entre saúde humana, animal e ambiental: desafios e perspectivas na implementação da Saúde Única no Brasil. **Derecho y Cambio Social**, [*S.l.*], v. 22, n. 81, p. e3142, 2025. DOI: 10.54899/dcs.v22i81.3142.

GUZMÁN, C. A. F. *et al.* A framework to guide planetary health education. **The Lancet Planetary Health**, [*S.l.*] v. 5, n. 5, p. e253-e255, 2021. DOI: 10.1016/S2542-5196(21)00110-8.

HIGASHI, C. S. *et al.* Avanço da esporotricose humana no Rio Grande do Norte (2016-2024): um desafio para a saúde pública. *In*: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 60., 2025, João Pessoa. **Anais [...].** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2025. p. 2745. ISSN 3086-1624.

JELEFF, M. *et al.* Vulnerability and One Health assessment approaches for infectious threats from a social science perspective: a systematic scoping review. **The Lancet Planetary Health**, [*S.l.*], v. 6, n. 8, p. e682-e693, 2022. DOI: 10.1016/S2542-5196(22)00097-3.

KHAN, M. S. *et al.* The growth and strategic functioning of One Health networks: a systematic analysis. **The Lancet Planetary Health**, [*S.l.*] v. 2, n. 6, p. e264-e273, 2018. DOI: 10.1016/S2542-5196(18)30084-6.

MILAN, E. P. *et al.* Estudo clínico e epidemiológico dos pacientes com esporotricose no estado do Rio Grande do Norte entre outubro de 2016 e março de 2023. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [*S.l.*], v. 27, supl. 1, p. 103286, 2023. DOI: 10.1016/j.bjid.2023.103286.

MOTTA, G. T. *et al.* One Health: action in Brazilian cases of sporotrichosis in humans and cats. **Pathogens**, [*S.l.*], v. 14, n. 3, 2025. DOI: 10.3390/pathogens14030225.

OLIVEIRA, P. R. F. *et al.* Emerging cases of cat-transmitted sporotrichosis driven by Sporothrix brasiliensis in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, [*S.l.*], v. 189, n. 4, 2024. DOI: 10.1007/s11046-024-00873-y.

OMS. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.** Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2022. ISBN 9789240060241.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [*S.l.*], v. 97, n. 6, p. 757-777, 2022. DOI: 10.1016/j.abd.2022.07.001.

POESTER, V. R. *et al.* First report of Sporothrix brasiliensis in a Southern Giant Petrel (Macronectes giganteus): implications for One Health. **Revista Iberoamericana de Micología**, [*S.l.*], v. 43, n. 2, p. 71-74, 2026. DOI: 10.1016/j.riam.2026.03.001.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Multifocal sporotrichosis associated with armadillo hunting in Midwest Brazil: an in-depth case study and comprehensive literature analysis. **Mycopathologia**, [*S.l.*], v. 189, n. 4, 2024. DOI: 10.1007/s11046-024-00854-1.

ROSA, J. V. M; QUARESMA, J. A. S. Sporotrichosis: an overview of the neglected disease reported worldwide in the last five years. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [*S.l.*], v. 58, 2025. DOI: 10.1590/0037-8682-0211-2025.

ROSSOW, J. A. *et al.* A One Health approach to combatting Sporothrix brasiliensis: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. **Journal of Fungi**, [*S.l.*], v. 6, n. 4, p. 1-27, 2020. DOI: 10.3390/jof6040247.

Anexos



Figura 1 - Características sociodemográficas dos participantes do estudo. (A) Faixa etária e gênero declarado; (B) raça/cor autodeclarada; e (C) profissão declarada. Nota: Na variável profissão, foi permitida a seleção de mais de uma categoria.



Figura 2 - Distribuição geográfica dos participantes no Rio Grande do Norte. Municípios de residência dos participantes, com destaque para os municípios-sede das oito Regiões de Saúde do estado.



Figura 3 - Relação dos participantes com os animais. (A) Posse e número; (B) espécies; (C) nível e tipo de contato; (D) busca por atendimento veterinário diante de ferida suspeita e motivos da não busca. Nota: (B), (C) e (D) admitiam múltiplas respostas.



Figura 4 - Condições ambientais e de infraestrutura dos participantes. (A) Destino dos resíduos; (B) características da pavimentação da rua; e (C) regularidade do abastecimento de água.



Tabela 1 - Conhecimento e práticas relacionadas à esporotricose animal entre os participantes do estudo (n=738)



Tabela 2 - Percepções sobre Saúde Única e integração intersetorial entre os participantes do estudo (n=738)



Tabela 3 – Acesso aos serviços veterinários e vigilância da esporotricose animal entre os participantes do estudo (n=738)



Tabela 4 – Ambiente, manejo animal e vulnerabilidades territoriais entre os participantes do estudo (n=738)



Tabela 5 - Associação entre contato e exposição a animais e o reconhecimento de sinais da esporotricose animal (n=738). Nota: χ^2(gl) = qui-quadrado de Pearson e graus de liberdade; p = significância; V = V de Cramer (magnitude).



Tabela 6 - Associação entre exposição ocupacional a animais e conhecimentos sobre manejo e encaminhamento de casos de esporotricose (n=738). Nota: χ^2(gl) = qui-quadrado de Pearson e graus de liberdade; p = significância; V = V de Cramer (magnitude).



Tabela 7 - Associação entre contato prévio com ações de Saúde Única e conhecimentos sobre manejo e encaminhamento de casos (n=738). Nota: χ^2(gl) = qui-quadrado de Pearson e graus de liberdade; p = significância; V = V de Cramer (magnitude).

CÓDIGO: SB0520

AUTOR: MARIA LAURA FERNANDES VELOZO

ORIENTADOR: JEFERSON DE SOUZA CAVALCANTE

TÍTULO: O EFEITO DO DMT EM RITMOS BIOLÓGICOS E NA PLASTICIDADE NEURAL DE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS: MITIGAÇÃO DE DÉFICITS NEUROQUÍMICOS DECORRENTES DA SENESCÊNCIA.

Resumo

Constantemente os mamíferos estão submetidos a processos adaptativos, influenciados por fatores naturais, que exigem ajustes fisiológicos orquestrados por um Sistema de Temporização Circadiano. Esse relógio biológico interno possui o Núcleo Supraquiasmático como marcapasso central que por sua vez, é regulado por três vias cruciais para o funcionamento dos ritmos endógenos, o Trato Retino-Hipotalâmico, o Trato Genículo-Hipotalâmico e a via mediada pelo neurotransmissor Serotonina. Embora o Sistema de Temporização Circadiano seja eficiente, o processo de envelhecimento causa déficits neuroquímicos, resultando em perdas funcionais e cognitivas ao organismo. Diante disso, o presente estudo possui como objetivo, realizar experimentos em ratos (Rattus norvergicus) e ,primatas não humanos, Saguis (Callithrix jacchus), jovens e idosos, buscando verificar se a ativação de receptores serotoninérgicos pelo DMT, princípio ativo encontrado na Ayahuasca, uma bebida alucinógena, pode restaurar a funcionalidade do marcapasso central e mitigar os efeitos morfológicos e funcionais da senescência, promovendo mudanças estruturais e neuroquímicas fundamentais para a ressincronização dos ritmos endógenos perdidos com o avanço da idade.

Palavras-chave: Senescência. DMT. Ayahuasca. Serotonina.

TITLE: The Effect of DMT on Biological Rhythms and Neural Plasticity in Young and Aged Animals: Mitigation of Neurochemical Deficits Resulting from Senescence.

Abstract

Mammals are constantly subject to adaptive processes influenced by natural factors, requiring physiological adjustments orchestrated by a Circadian Timing System. This internal biological clock features the suprachiasmatic nucleus as its central pacemaker,

which is regulated by three pathways crucial to the functioning of endogenous rhythms: the retinohypothalamic tract, the geniculohypothalamic tract, and a pathway mediated by the neurotransmitter serotonin. Although the circadian timing system is efficient, the aging process causes neurochemical deficits, resulting in functional and cognitive losses for the organism. Given this context, the present study aims to conduct experiments on young and aged rats (Rattus norvegicus) and non-human primates specifically common marmosets (Callithrix jacchus) to determine whether the activation of serotonergic receptors by DMT (the active principle found in Ayahuasca, a hallucinogenic brew) can restore the functionality of the central pacemaker and mitigate the morphological and functional effects of senescence, thereby promoting the structural and neurochemical changes essential for resynchronizing endogenous rhythms lost with advancing age.

Keywords: Senescence. DMT. Ayahuasca. Serotonin.

Introdução

Os seres vivos continuamente são submetidos a influências ambientais e sazonais, exigindo ajustes fisiológicos e metabólicos para se adaptarem ao meio.1 Esses ajustes acontecem por meio de relógios biológicos intrínsecos, sob a influência de fatores naturais como o ciclo claro-escuro, regulando vários processos bioquímicos e fisiológicos com período aproximado de 24h.1,2 Os ritmos são considerados de caráter endógeno, pois mesmo em condições constantes, ou seja, na ausência de pistas externas, persistem, demonstrando a evidência de que há um temporizador interno.1,2

Sobre os mamíferos, especificamente, as estruturas neurais que são capazes de modular a adaptação, estas fazem parte de um Sistema de Temporização Circadiana (STC) composto por um marcapasso central e vias de entrada e saída que regulam o comportamento do metabolismo e a fisiologia do animal sob a influência de ciclos ambientais.3,4

Dentre essas estruturas neurais, duas são destaques importantes para tornar a organização temporal interna do organismo funcional, são elas: o Núcleo Supraquiasmático (NSQ), marcapasso central, localizado acima do quiasma óptico e o Folheto Intergeniculado (FIG) localizado no tálamo.3

A regulação do STC acontece por meio de duas vias que são cruciais para o funcionamento do NSQ: TRH e o TGH.4 O TRH (Trato Retino-Hipotalâmico) tem sua origem localizada nas células ganglionares da retina e tem a função de levar a informação luminosa diretamente para o NSQ, importante, principalmente, para a regulação do ciclo claro-escuro.5 Já o TGH (Trato Genículo-Hipotalâmico) origina-se no FIG e integra informações fóticas e não fóticas, ajudando a levar informações comportamentais e do estado interno do animal ao relógio central NSQ, as quais também são capazes de influenciar o seu tempo biológico.7

Além dessas duas principais vias, há uma terceira via de modulação para o STC mediada pelo neurotransmissor Serotonina (5-HT), cujos corpos celulares localizam-se no complexo da rafe mesencefálica e possuem a função de auxiliar na modulação da

ritmicidade gerada pelo STC, ou seja, através da recepção de informações diretas da retina e da conexão ao NSQ e o FIG, a Serotonina é capaz de modular, principalmente, a inibição da resposta do relógio à luz e a modulação do ciclo sono/vigília, sendo fundamental para a estabilidade temporal do organismo.9

Embora o STC seja eficiente, ele sofre deteriorações constantes, como a diminuição de neurônios e neurotransmissores, por causa do processo de envelhecimento, o que leva à fragmentação do ritmo de atividade-repouso e sua consequente desregulação.13 Essa disritmia associa-se ao declínio cognitivo, à redução da amplitude dos ritmos biológicos e ao aumento do estresse oxidativo, favorecendo processos neurodegenerativos.14

Diante desse cenário, a busca por intervenções que promovam a plasticidade neural torna-se fundamental. A Ayahuasca, uma bebida alucinógena muito utilizada em cerimônias indígenas na América do Sul, rica em dimetiltriptamina (DMT) e β-carbolinas, surge como uma ferramenta promissora, fisiologicamente segura e sem riscos de dependência química.15,16O seu potencial terapêutico reside em sua atuação como agonista do sistema serotonérgico, a partir do DMT, que atua sobre os receptores de Serotonina os quais encontram-se estrategicamente distribuídos nos componentes do STC, como o Núcleo Supraquiasmático.17,18 Estudos indicam que a Ayahuasca têm o potencial de reabrir janelas de plasticidade neural, promovendo mudanças estruturais e neuroquímicas capazes de influenciar diretamente no potencial de respostas do sistema serotoninérgico.15,19

Assim, o presente estudo busca investigar se a ingestão periódica de Ayahuasca, por ratos e saguis, pode atenuar a fragmentação rítmica e mitigar os déficits neuroquímicos e morfológicos no marcapasso circadiano decorrentes da idade.

Metodologia

Serão utilizados ratos (Rattus norvergicus) linhagem Wistar machos e fêmeas com aproximadamente 3 meses de idade (Jovens) e de 16 meses idade (idosos). No total, serão utilizados 192 animais, (96 machos e 96 fêmeas), jovens e 192 animais (machos e fêmeas) idosos. Antes das fases experimentais os animais serão alojados em gaiolas com livre acesso a água e comida, em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante a fase experimental os animais serão alojados, 4 animais em cada gaiola, quatro gaiolas por experimento em uma sala de coleta de dados dos ritmos biológicos.

Para a etapa de uso de primatas não humanos, Saguis (Callithrix jacchus), serão utilizados animais machos e fêmeas (mesma proporção) de 2-4 anos (jovens) e acima de 6,5 anos (idosos). Para cada grupo experimental um n=4 de animais será utilizado. Esses animais serão provenientes do núcleo de primatologia da UFRN e serão mantidos em duas salas experimentais do laboratório de estudos avançados em primatas da UFRN, em gaiolas isoladas, sem contato visual, mas com contato acústico e olfativo entre si. Os animais receberão itens alimentares duas vezes ao dia, em horários irregulares, ao longo da fase de claro.

Para a administração de Ayahuasca, produzida e cedida pelo templo da Barquinha, Ji-Paraná, estado de Rondônia, ao Laboratório de Estudos Neuroquímicos (LENq). Será utilizada uma dosagem de 1.67 mL/300g de peso corporal.20 Essa dose é baseada em estudos prévios e será administrada via gavagem nos dias 1 (D1), 12 (D12), 23 (D23) e 34 (D34) do experimento, onde será usada uma cânula transparente convencional de plástico flexível.

Um teste de Atividade Locomotora (Campo Aberto), para roedores, será realizado para definir o efeito que a ayahuasca pode apresentar na atividade locomotora dos animais. O teste é realizado usando um aparato circular de madeira, de tamanhos diferentes para ratos e saguis, dividido em 2 subáreas (área interna e área externa). Uma câmera colocada acima do aparato e conectada a um computador contendo um programa de rastreamento de animais, será usada com a finalidade de registro comportamental. Assim, os animais serão colocados no centro do aparato, em uma única sessão de 10 minutos, e os seguintes comportamentos serão avaliados: distância total percorrida, velocidade média e tempo de permanência em cada sub área.

Experimento 1 (LD 12/12 Claro- Escuro): Os animais experimentais serão submetidos a 4 dosagens do chá de ayahuasca (A1, A2, A3 e A4) que serão aplicadas nos dias D1, D12, D23 e D34, respectivamente. Nesses mesmos dias de aplicação os animais serão submetidos ao teste em campo aberto, 10 minutos antes da aplicação para a avaliação basal e duas horas e 10 minutos após e durante 2 horas para avaliar possível efeito da dosagem. Entre os intervalos dessas dosagens os animais ficarão em um regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro durante 10 dias, dentro de uma caixa experimental para avaliação de seu ritmo de atividade repouso. Esse procedimento será realizado em quatro caixas, em cada caixa 4 animais adultos jovens/idosos.

Experimento 2 (DD – Avaliação do Ritmo Endógeno): Entre os intervalos das aplicações A2 e A3, A3 e A4 os animais serão submetidos a um regime de escuro constante durante 10 dias, para avaliação do efeito da Ayahuasca no seu ritmo de atividade/repouso endógeno (em livre-curso). Esse procedimento será realizado em quatro caixas, em cada caixa 4 animais adultos jovens/idosos.

Experimento 3 (LD 12/12; LD 10/14 - Ressincronização): Entre os intervalos de A1 para A2 e A3 para A4, os animais serão mantidos em um regime de 12/12 claro escuro. Já entre os intervalos de A2 para A3 e A4 para o fim do experimento, os animais serão submetidos a um regime de 10/14 claro/escuro. Essas mudanças serão feitas para a análise de ressincronização e atraso de fase dos animais.

Os experimentos serão feitos em quatro caixas, em cada caixa 4 animais adultos jovens/idosos. Os mesmos procedimentos serão feitos com um grupo controle que não receberá a dosagem do veículo experimental, e sim uma dosagem de salina para mimetizar o procedimento de ingestão. O procedimento será feito com grupos (experimental e controle) só com machos e depois será repetido só com fêmeas.

Nos três experimentos a atividade motora dos animais será registrada através de sensores infravermelhos. Os dados serão coletados através de um software e analisados posteriormente. Serão avaliados o período, o percentual de variância, amplitude, a média ajustada ao ritmo, Alfa, Acrofase e a variabilidade intradiária. No caso das

fêmeas, será realizada uma semana de acompanhamento do ciclo, para garantir que estejam com a ciclagem estral normal.

Para corroborar com as hipóteses propostas, grupos de animais serão destinados a análise histoquímica de diversos marcadores neuroativos clássicos para os componentes do STC. Bem como para substâncias que auxiliam na análise morfológica, como as proteínas ligantes de cálcio e ainda alguns leitores inflamatórios-interleucinas e do relógio biológico. Uma das séries de cada encéfalo será utilizada para coloração citoarquitetônica pelo método de Nissl, utilizando como corante a tionina. Esse procedimento é feito com cada um dos animais utilizados, uma vez que, podem ocorrer diferenças individuais nas estruturas cerebrais.

Para tanto, esses animais serão perfundidos, passarão pelo processo de craniotomia, para a remoção dos cérebros, e estes serão cortados em secções finas com o auxílio do criostato. As secções contendo as áreas de interesse (NSQ e FIG) serão submetidas às etapas de imuno-histoquímica e ósmio. Após essas etapas, depois de prontas as lâminas serão avaliadas em campo claro com auxílio do microscópio. Serão contabilizados o número de corpos neuronais marcados, assim como a densidade óptica relativa das projeções dentro das áreas de interesse . Os valores serão analisados por meio da estatística.

Resultados e Discussões

Com base nos métodos, espera-se que o presente estudo obtenha resultados compatíveis com aqueles encontrados na literatura científica, considerando fatos observados em pesquisas anteriores.

Campo Aberto:

Sobre o teste de Atividade Locomotora (Campo Aberto) que será realizado tanto em ratos, quanto em saguis, para definir o efeito da Ayahuasca sobre certos comportamentos dos animais.21 Com relação a alguns parâmetros de atividade locomotora, alimentação e comportamento emocional do tipo ansioso, estudos prévios demonstraram que doses da Ayahuasca quando administradas demonstram melhora, principalmente, no ganho de peso e na atividade de autolimpeza, além de diminuir comportamento de coçar em saguis, ato muito comum em situações de estresse e depressão.20,21 Já em roedores, o que se espera observar inicialmente que o DMT não afeta a tigmotaxia, o que sugere que o efeito agudo não representa uma ansiedade clássica, mas sim uma potenciação da neofobia (medo do ambiente desconhecido).15 Posteriormente, segundo alguns estudos há uma redução considerável da ansiedade, facilitando a extinção de memórias de medo.15

Ciclo Claro-Escuro:

A partir do Experimento 1 (LD 12/12 Claro- Escuro), algumas mudanças no ciclo claro-escuro poderão ser observados sobre os efeitos da Ayahuasca que interage com esse

ciclo através da modulação do Sistema de Temporização Circadiana (STC), agindo como um inibidor da resposta do relógio biológico à luz.18

Segundo algumas fontes, através da função agonista da dimetiltriptamina presente na bebida alucinógena Ayahuasca, que atua diretamente sobre os receptores 5-HT1A, 5-HT2A e 5-HT2C, ela será capaz de ativá-los e potencializar a liberação de serotonina no STC.19,17 As consequências da ampliação da atividade do sistema serotonérgico, de acordo com alguns estudos é, principalmente a inibição da resposta do relógio biológico à luz, ocorrendo um bloqueio da mudança de fase no ciclo claro-escuro que a luz normalmente provocaria.18 Isso significa que o relógio biológico torna-se menos sensível a "ajustes" feitos por estímulos luminosos.18

Ritmo Endógeno:

O Experimento 2 (DD – Avaliação do Ritmo Endógeno) possibilitará entender se, ao reduzir a influência da luz (o principal sincronizador externo), o sistema pode expressar de forma mais clara seu ritmo endógeno (em livre-curso). O presente estudo visa entender se essa mudança pode reabrir janelas de plasticidade, permitindo que os componentes do STC recuperem sua capacidade de gerar ritmo interno em animais idosos.15,19 O que se espera desses resultados é que a plasticidade seja positiva e que haja um avanço na restauração do ritmo interno desses animais causada pela administração de Ayahuasca rica em dimetiltriptamina.15

Ressincronização:

Espera se que a realizar o Experimento 3 (LD 12/12; LD 10/14 - Ressincronização), onde serão avaliadas as dificuldades de ressincronização sofridas pelo animais jovens, mas também, principalmente, de idosos, onde determinados estudos apresentam que o envelhecimento provoca atrasos de sincronização e readaptação aos fatores ambientais. O organismo idoso tende a permanecer em disritmia por mais tempo, por isso, será analisado o potencial que a Ayahuasca tem de modular o Sistema de Temporização Circadiana (STC) nesse sentido.23,24

Análise histoquímica de marcadores neuroativos clássicos:

Neurônios imunorreativos ao Neuropeptídeo Y (NPY) são observados no núcleo pré-geniculado (PGN) do sagui (Callithrix jacchus), homólogo ao Folheto Intergeniculado (FIG) de roedores.29 Determinada pesquisa, realizada em Ratos Wistar machos, indica que durante o processo de envelhecimento há uma redução da expressão do gene NPY e consequentemente da entrada de NPY no NSC, prejudicando os ajustes não fóticos que o FIG fornece ao sistema circadiano.29

Com relação ao polipeptídio intestinal vasoativo (VIP), produzido por neurônios localizados, principalmente, na porção ventrolateral do NSQ.30 O envelhecimento causa uma redução significativa tanto na quantidade quanto no padrão de expressão do VIP núcleo supraquiasmático (NSQ).30 Um estudo apresentou que, enquanto em ratos jovens, sobretudo fêmeas, é observado um ritmo de expressão de VIP de 24 horas, esse sincronismo desaparece nos animais idosos, causado pelo declínio no nível de mRNA de VIP.30

Além disso, a mesma pesquisa também analisou comparativamente os níveis de vasopressina (VP), produzidos, principalmente por neurônios localizados no NSQ dorsomedial. Diferente do observado com o VIP, o artigo relata que os níveis de VP permanecem completamente intactos durante o processo de envelhecimento.30 O estudo conclui que o ritmo de corticosterona, regulado em parte pela VP, pode permanecer mantido em animais idosos.30 Além disso, a VP, embora resistente ao envelhecimento no NSQ, pode ter sua expressão reduzida com a idade em outras áreas cerebrais, como no núcleo do leito da estria terminal.30

Sobre o ácido gama-aminobutírico (GABA), produzido densamente por neurônios do núcleo supraquiasmático (NSQ) e também em algumas vias extrínsecas como o FIG.31 Há um estudo que observou uma significativa diminuição tanto no número quanto na área ocupada pelos terminais pré-sinápticos GABAérgicos.31 Não foram encontradas alterações significativas nos níveis de mRNA da GAD67, mas houve uma deterioração específica na fração sináptica, ou seja, na comunicação entre os neurônios.31

Por fim, sobre os níveis do neurotransmissor Serotonina (5-HT), cujos corpos celulares localizam-se no tronco encefálico, especificamente no complexo da rafe mesencefálica, um estudo comparativo realizado em ratos jovens e idosos indica que os níveis desse neurotransmissor tendem a diminuir devido ao processo de envelhecimento.32 O artigo ressalta que houve uma redução estatisticamente significativa especificamente no córtex frontal, onde os níveis de produção do neurotransmissor caíram em aproximadamente 42% em comparação com ratos de 3 meses.32 Além disso, observou-se que a senescência afeta de forma distinta as regiões onde o neurotransmissor é produzido e onde ele é liberado, enquanto no tronco encefálico os níveis de 5-HT permaneceram estáveis mesmo na velhice, os níveis do metabólito 5-HIAA diminuíram nessa região, possivelmente devido a uma redução na atividade da enzima MAO-A, responsável pelo catabolismo (degradação) da serotonina.32

Análise de proteínas ligantes de cálcio leitores inflamatórios-interleucinas:

A Calbindina (CB) é uma importante proteína que conecta, ou seja, está presente em toda a extensão do eixo das Amígdalas, do Hipocampo, do relógio biológico NSQ e o do PGN de saguis (Callithrix jacchus).25 Alterações ou perdas nessas subpopulações de células estão relacionadas a sintomas emocionais em doenças neurológicas, como o Alzheimer.25 Além disso, estudos demonstram que a memória do medo é alterada em camundongos machos com deleção do gene Calb1, e que camundongos com deleção completa do gene, de ambos os sexos, apresentam menos comportamento ansioso.26 Em animais idosos, por causa do processo de envelhecimento, é observada uma redução da população de células que apresentam CB em sua composição, levando a consequências como: falha na regulação do ritmo circadiano, da temperatura corporal e dos níveis de melatonina e cortisol.27

Um estudo realizado em ratos machos em 3 idades distintas: 1 mês (adolescentes), 6 meses (adultos jovens) e 12 meses (adultos), demonstrou que os níveis de parvalbumina (PV) sofrem alterações significativas e específicas por região ao longo do desenvolvimento e da vida adulta desses animais.33 A parvalbumina (PV) é uma proteína ligante de cálcio expressa em subpopulações específicas de neurônios inibitórios GABAérgicos que durante o processo de envelhecimento, segundo o estudo, tem redução seletiva no hipocampo, sugerindo uma densidade aproximadamente 15% a

45% menor nos ratos de 6 a 12 meses quando comparados ao de 1 mês.33 Ao contrário do hipocampo, em áreas como o córtex somatossensorial e o córtex retrosplenial, os níveis de produção de PV permaneceram relativamente estáveis, independente da idade analisada.33 Por fim, no córtex pré frontal, também analisado pelos autores, observou-se uma tendência de aumento no número de celular PV+ com o processo de envelhecimento, refletindo possivelmente a maturação tardia dos circuitos inibitórios nessa região específica.33

Mudanças funcionais e estruturais na neuroglia, um grupo de células não neuronais, como os astrócitos e microglia, que compõem o sistema nervoso central, podem ocorrer devido às condições patológicas como Doença de Alzheimer ou efeitos adversos do envelhecimento.35 Essas mudanças diferem significamente daquelas observadas nos neurônios, enquanto estes tendem a diminuir em número e em produção de neurotransmissores e proteínas de cálcio, como apresentado anteriormente por diversas pesquisas, a neuroglia apresenta um aumento na reatividade, manifestado por uma maior expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) em áreas como o Núcleo Supraquiasmático (NSQ).35

Um estudo demonstrou que ao comparar ratos, machos e fêmeas, no processo de envelhecimento, notou-se diferenças nas alterações da densidade de componentes imunorreativos à GFAP, na porção dorsomedial do NSQ, sendo maior nas fêmeas e não havendo aumento significativo em machos adultos.36

Em outra pesquisa, realizada em saguis (Callithrix jacchus), também observou-se um aumento significativo na expressão de GFAP nos saguis idosos em comparação com os adultos.27 O estudo demonstrou que quanto mais avançada a idade, maior a presença dessa proteína no NSQ.27Além disso, os autores sugerem que esse aumento na gliogênese ocorre em resposta ao declínio neuronal observado na mesma região durante o envelhecimento, apoiando-se na ideia de um processo compensatório entre a morte neuronal e a reação glial nos saguis idosos.27

Conclusão

O presente estudo busca investigar os efeitos do psicoativo DMT, encontrado na Ayahuasca, uma bebida alucinógena, sobre os parâmetros comportamentais, neuroquímicos e morfológicos do Sistema de Temporização Circadiana em ratos e saguis de diferentes idades e sexo. A pesquisa encontra-se em fase de execução, portanto os resultados esperados dos experimentos poderão oferecer dados para um melhor entendimento dos mecanismos neurobiológicos por trás do processo de envelhecimento que causa disritmia dos ritmos biológicos e neurodegeneração. Assim, este estudo reforça a importância da investigação de substâncias agonistas serotoninérgicas como ferramentas potenciais para mitigar os déficits neuroquímicos e aumentar a plasticidade neural frente às consequências do processo de envelhecimento.

Referências

1. Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2019). The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. Biology, 8(1), 13. https://doi.org/10.3390/biology8010013

2. Duffy, J. F., & Czeisler, C. A. (2009). Effect of Light on Human Circadian Physiology. Sleep medicine clinics, 4(2), 165–177. https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2009.01.004

3. CAVALCANTE, J. S.; NASCIMENTO JR., E. S.; COSTA, M. S. M. O. Componentes centrais do sistema de temporização circadiana: O Núcleo Supraquiasmático e o Folheto Intergeniculado. Neurociências, 2006. v. 3, p. 1–10.

4. Morin L. P. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. Experimental neurology, 243, 4–20. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.026

5. Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. The Journal of comparative neurology, 146(1), 1–14. https://doi.org/10.1002/cne.901460102

7. Moore, R. Y., & Card, J. P. (1994). Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. The Journal of comparative neurology, 344(3), 403–430. https://doi.org/10.1002/cne.903440306

9. PONTES, André Luiz Bezerra de et al. Serotonin and circadian rhythms. Psychology & Neuroscience, v. vol. 3, n. no. 2, p. p.p. 217-228, jul. 2010.http://hdl.handle.net/11449/27094

13. Zhou, J. N., & Swaab, D. F. (1999). Activation and degeneration during aging: a morphometric study of the human hypothalamus. Microscopy research and technique, 44(1), 36–48. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19990101)44:1<36::AID-JEMT5>3.0.CO;2-F

14. Zhao, J., Warman, G. R., & Cheeseman, J. F. (2019). The functional changes of the circadian system organization in aging. Ageing research reviews, 52, 64–71. https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.04.006

15. Cameron, L. P., Benson, C. J., Dunlap, L. E., & Olson, D. E. (2018). Effects of N, N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. ACS chemical neuroscience, 9(7), 1582–1590. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00134

16. Escobar, Arturo & Roazzi, Antonio. (2016). 2010 Escobar & Roazzi. Panorama Contemporâneo do Uso Terapêutico de Substâncias Psicodélicas. Ayahuasca e Psilocibina.

17. Riba, J., Valle, M., Urbano, G., Yritia, M., Morte, A., & Barbanoj, M. J. (2003). Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 306(1), 73–83. https://doi.org/10.1124/jpet.103.049882

18. Morin L. P. (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. Annals of medicine, 31(1), 12–33. https://doi.org/10.3109/07853899909019259

19. de Castro-Neto, E. F., da Cunha, R. H., da Silveira, D. X., Yonamine, M., Gouveia, T. L., Cavalheiro, E. A., Amado, D., & Naffah-Mazzacoratti, M.daG. (2013). Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. World journal of biological chemistry, 4(4), 141–147. https://doi.org/10.4331/wjbc.v4.i4.141

20. Da Silva, F. S., Silva, B. A., Soares, G. M. M., Malgaroli, M., Sousa, M. B. C., & Hallak, J. E. C. (2019). Acute effects of ayahuasca in a juvenile non-human primate model of depression. Brazilian Journal of Psychiatry, 41(4), 280–288. https://doi.org/10.1590/1516-4446-2018-0140

21. Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. European journal of pharmacology, 463(1-3), 3–33. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x

23. Davidson, A. J., Yamazaki, S., Arble, D. M., Menaker, M., & Block, G. D. (2008). Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. Neurobiology of aging, 29(3), 471–477. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.10.018

24. Valentinuzzi, V. S., Scarbrough, K., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (1997). Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. The American journal of physiology, 273(6), R1957–R1964. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1957

25. de Góis Morais, P. L. A., Paiva, K. M., Oliveira, R. F., Santana, M. A. D., Guzen, F. P., Engelberth, R. C. G. J., de Souza Cavalcante, J., Nascimento, E. S., Junior, & Cavalcanti, J. R. L. P. (2021). Distribution and morphology of calbindin neurons in the Amygdaloid Complex of the marmoset monkey (callithrix jacchus). Journal of chemical neuroanatomy, 112, 101914. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101914

26. Harris, E. P., Abel, J. M., Tejada, L. D., & Rissman, E. F. (2016). Calbindin Knockout Alters Sex-Specific Regulation of Behavior and Gene Expression in Amygdala and Prefrontal Cortex. Endocrinology, 157(5), 1967–1979. https://doi.org/10.1210/en.2016-1055

27. Engelberth, R. C., Silva, K. D., Azevedo, C. V., Gavioli, E. C., dos Santos, J. R., Soares, J. G., Nascimento Junior, E. S., Cavalcante, J. C., Costa, M. S., & Cavalcante, J. S. (2014). Morphological changes in the suprachiasmatic nucleus of aging female marmosets (Callithrix jacchus). BioMed research international, 2014, 243825. https://doi.org/10.1155/2014/243825

29. Fiuza, F. P., Silva, K. D., Pessoa, R. A., Pontes, A. L., Cavalcanti, R. L., Pires, R. S., Soares, J. G., Nascimento Júnior, E. S., Costa, M. S., Engelberth, R. C., & Cavalcante, J. S. (2016). Age-related changes in neurochemical components and retinal projections of rat intergeniculate leaflet. Age (Dordrecht, Netherlands), 38(1), 4. https://doi.org/10.1007/s11357-015-9867-9

30. Krajnak, K., Kashon, M. L., Rosewell, K. L., & Wise, P. M. (1998). Aging alters the rhythmic expression of vasoactive intestinal polypeptide mRNA but not arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei of female rats. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 18(12), 4767–4774. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04767.1998

31. Palomba, M., Nygård, M., Florenzano, F., Bertini, G., Kristensson, K., & Bentivoglio, M. (2008). Decline of the presynaptic network, including GABAergic terminals, in the aging suprachiasmatic nucleus of the mouse. Journal of biological rhythms, 23(3), 220–231. https://doi.org/10.1177/0748730408316998

32. Míguez, J. M., Aldegunde, M., Paz-Valiñas, L., Recio, J., & Sánchez-Barceló, E. (1999). Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996), 106(11-12), 1089–1098. https://doi.org/10.1007/s007020050225

33. Jennifer A. Honeycutt , Kevin M. Keary III , Vanessa M. Kania , James J. Chrobak; A idade do desenvolvimento influencia diferencialmente a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina em ratos: evidências de uma diminuição seletiva na contagem de células de parvalbumina no hipocampo. Dev Neurosci 29 de junho de 2016; 38 (2): 105–114. https://doi.org/10.1159/000444447

35. Rodríguez, J. J., Noristani, H. N., & Verkhratsky, A. (2012). The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. Progress in neurobiology, 99(1), 15–41. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.010

36. Tsukahara, S., Tanaka, S., Ishida, K., Hoshi, N., & Kitagawa, H. (2005). Age-related change and its sex differences in histoarchitecture of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of F344/N rats. Experimental gerontology, 40(3), 147–155. https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.10.003

CÓDIGO: SB0522

AUTOR: ALANA BEATRIZ BRITO COSTA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Histopatologia das alterações em ductos salivares durante a indução química da carcinogênese de língua.

Resumo

O carcinoma epidermóide oral é a neoplasia maligna mais frequente da cavidade oral, sendo a língua um dos sítios anatômicos mais acometidos. Entretanto, ainda são escassos os estudos acerca das alterações que ocorrem nos ductos excretores das glândulas salivares menores linguais durante a carcinogênese oral. O presente estudo objetivou analisar as alterações histopatológicas dos ductos excretores das glândulas salivares menores de língua durante o processo de carcinogênese oral quimicamente induzida em ratos. Foram analisadas amostras de língua de ratos machos Wistar submetidos à indução química com 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO), em períodos compreendidos entre 8 e 30 semanas. Após processamento histológico, 44 espécimes foram avaliados em microscopia óptica quanto à presença de alterações ductais. Observou-se hiperplasia ductal em 29 casos (65,9%), metaplasia ductal em 31 (70,5%), displasia ductal em 19 (43,2%) e acúmulo de muco intraductal em 34 (77,3%). Entre os padrões de hiperplasia, destacaram-se a estratificação colunar e a hiperplasia intraductal com formação de pontes, enquanto a metaplasia mucosa foi o tipo mais frequente. Conclui-se que alterações ductais foram frequentemente identificadas durante o processo de carcinogênese oral induzida, contribuindo para a compreensão do comportamento dos ductos excretores das glândulas salivares menores nesse contexto.

Palavras-chave: Carcinogênese oral; língua; glândulas salivaresmenores; 4-NQO.

TITLE: Histopathology of Changes in Salivary Ducts During the Chemical Induction of Tongue Carcinogenesis.

Abstract

Oral squamous cell carcinoma is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, with the tongue being one of the most frequently affected anatomical sites.

However, there are still few studies on the changes that occur in the excretory ducts of the minor salivary glands of the tongue during oral carcinogenesis. The present study aimed to analyze the histopathological changes in the excretory ducts of the minor salivary glands of the tongue during the process of chemically induced oral carcinogenesis in rats. Tongue samples were analyzed from male Wistar rats subjected to chemical induction with 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) over periods ranging from 8 to 30 weeks. After histological processing, 44 specimens were evaluated under a light microscope for the presence of ductal changes. Ductal hyperplasia was observed in 29 cases (65.9%), ductal metaplasia in 31 (70.5%), ductal dysplasia in 19 (43.2%), and intraductal mucus accumulation in 34 (77.3%). Among the patterns of hyperplasia, columnar stratification and intraductal hyperplasia with bridge formation stood out, while mucous metaplasia was the most frequent type. It is concluded that ductal changes were frequently identified during the process of induced oral carcinogenesis, contributing to the understanding of the behavior of the excretory ducts of the minor salivary glands in this context.

Keywords: Oral carcinogenesis; tongue; minor salivary glands; 4-NQO.

Introdução

No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte por doença, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Considerando a cavidade oral como uma das principais localizações do câncer, foram estimados 11.180 casos em homens e 4.010 em mulheres no Brasil em 2021. Em 2018, houve 1.975 casos de óbitos por carcinoma epidermóide em língua, onde 77% dos casos ocorreram em homens (DA SILVA SOUTO et al, 2023).

O carcinoma epidermóide oral (CEO) tem origem nos tecidos epiteliais e os locais mais acometidos são borda lateral de língua, lábio inferior e assoalho oral. Entretanto, qualquer superfície oral pode ser afetada. Considerada uma doença predominantemente do sexo masculino, atinge principalmente indivíduos acima dos 45 anos de idade e leucodermas (NEVILLE et al, 2009). O carcinoma epidermóide de língua é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, com evidências recentes sugerindo aumento da incidência em pacientes mais jovens. As taxas estimadas de sobrevida familiar em 5 e 10 anos são de 65,8% e 57,6%, respectivamente (DANG et al, 2023). Frente à importância do entendimento do processo de carcinogênese oral, objetivando contribuir na melhoria das condições de tratamento e prognóstico dos pacientes acometidos por esta enfermidade.

O presente trabalho tem por objetivo analisar, descritiva e comparativamente, as características histopatológicas e realizar a mensuração histomorfométrica das lesões em ductos excretores de glândulas salivares menores línguas durante o processo de indução química da carcinogênese oral. O entendimento do processo de desenvolvimento do câncer oral, em especial do carcinoma epidermóide de língua que é o mais prevalente nessa região anatômica, possui fundamental importância.

Pouco se sabe a respeito das repercussões em ductos excretores de glândulas salivares menores linguais durante o processo evolutivo de indução da carcinogênese oral, visto que esses ductos excretores se comunicam com a superfície lingual, podendo ser uma

via de propagação do carcinoma epidermóide para as glândulas salivares menores linguais.

Desta forma o presente plano de trabalho tem por objetivo realizar a análise histopatológica das alterações ductais das glândulas salivares menores, considerando o processo de evolução da carcinogênese oral quimicamente induzida em ratos. Este plano de trabalho de iniciação científica representa a uma etapa intermediária do projeto aprovado no Edital Universal (Chamada 18/2021), processo nº 409414/2021-2 que inclui a indução química, análise histopatológica das diferentes etapas da carcinogênese oral e sua correlação com as alterações em ductos excretores das glândulas salivares menores em língua.

Assim, serão obtidas informações preciosas para as próximas etapas que serão realizadas em estudo em outros planos de trabalho, com o intuito de contribuir para a ciência quanto ao desenvolvimento de novas terapias de controle celular, inibindo a metástase e combatendo essas neoplasias malignas tão prevalentes nos dias atuais, melhorando não só as técnicas de tratamento oncológico, mas tornando-as mais precisas e, principalmente, melhorando a vida dos pacientes acometidos por tais enfermidades.

Metodologia

METODOLOGIA

3.1. Caracterização do Estudo

O presente estudo consiste em uma análise clínica, descritiva e comparativa dos carcinomas epidermóides orais de língua, quimicamente induzidas pelo 4-NQO em ratos, também foi realizada a mensuração de extensão através da morfometria.

3.2. Amostra e Indução Química das Lesões:

O protocolo experimental foi constituído por 50 ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, providas de comedouro e bebedouro, sendo mantidos em grupos de três ou quatro animais por gaiola. Foram submetidos a condições controladas de temperatura, de 24 ± 2 °C, e ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro. Os animais receberam ração e água ad libitum.

O peso corporal de cada animal foi aferido a cada sete dias, enquanto o consumo de água e ração por gaiola foi acompanhado diariamente ao longo das 37 semanas experimentais.

A amostra foi constituída por um grupo controle, composto por 10 animais, e um grupo experimental, composto por 40 animais. No grupo experimental, o agente carcinógeno

4-NQO foi diluído na água disponibilizada nos bebedouros (figura 1), conforme protocolo descrito na literatura (Supsavhad et al., 2016).

Após os períodos experimentais estabelecidos, os animais foram submetidos à eutanásia mediante administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina a 5% e xilazina a 2% (0,3ml/100g). As lesões da cavidade oral foram coletadas e fotografadas para análise macroscópica, sendo posteriormente mensuradas e fixadas em formaldeído a 10%, posteriormente emblocadas em parafina e cortadas em micrótomo para a análise histopatológica e histomorfométrica.

3.3. Análise histopatológica e histomorfométrica

Análise histopatológica foi realizada confirmando a presença do carcinoma epidermóide de língua, com posterior análise do front de invasão tumoral, análise histomorfométrica com a mensuração da profundidade de invasão tumoral e a mensuração da profundidade de invasão neoplásica relacionadas ao processo de indução química da carcinogênese oral em ratos.

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica utilizando microscópio da marca OPTIKA-Italy. As imagens foram obtidas por meio de sistema de captura acoplado ao microscópio, também da marca OPTIKA-Italy.

Foram avaliadas a presença ou ausência de hiperplasia ductal, os diferentes padrões morfológicos de hiperplasia, a presença e os tipos de metaplasia ductal, a ocorrência de displasia ductal e o acúmulo de muco intraductal.

3.4. Análise estatística

Para a análise estatística, os dados coletados foram inicialmente organizados em planilha específica no programa Microsoft Excel (Microsoft Windows) e posteriormente transferidos para o programa estatístico SPSS, versão 20.0 (IBM).

Inicialmente, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnoff para verificar a normalidade ou não dos dados obtidos. Casos os dados sejam não paramétricos utilizaremos o teste de Kruskal-Wallis (KW). Para dados não paramétricos, seria utilizado o teste de Kruskal-Wallis, enquanto, para dados paramétricos, seria utilizado o teste ANOVA. Para avaliação de possíveis correlações entre as variáveis, foi previsto o teste de correlação de Spearman.

3.5. Aspectos éticos

O presente trabalho integra o projeto aprovado no Edital Universal do CNPq 2021 (nº 409414/2021-2) intitulado “Estudo clínico patológico e imunohistoquímico da evolução de carcinomas epidermóides orais induzidos quimicamente em ratos”.

O protocolo foi submetido à apreciação de seu conteúdo e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), sob o número 051/2022.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Durante o desenvolvimento da pesquisa, foram analisados 44 espécimes de língua, distribuídos em diferentes períodos de indução, variando de 8 a 30 semanas.

A avaliação histopatológica observou a presença de hiperplasia ductal, metaplasia ductal, displasia ductal e acúmulo de muco no ducto, além da classificação dos diferentes padrões morfológicos de hiperplasia e metaplasia.

De maneira geral, os achados apresentaram variação conforme o período de indução, com maior frequência de alterações ductais em determinados períodos experimentais. Entre as alterações avaliadas, a metaplasia ductal e o acúmulo de muco apresentaram maior frequência no conjunto das amostras, enquanto a displasia ductal foi observada em menor proporção. A hiperplasia ductal também esteve presente em parte significativa das amostras, sendo identificados diferentes padrões morfológicos.

4.1. Hiperplasia ductal

A hiperplasia ductal foi identificada em 29 das 44 amostras avaliadas (65,9%), enquanto 15 amostras (34,1%) não apresentaram essa alteração.

A ocorrência de hiperplasia variou entre os períodos de indução. Foram identificados casos nos grupos de 8, 12, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 27, 28 e 30 semanas. Nos grupos de 25 e 26 semanas não foi identificada hiperplasia ductal.

As maiores frequências absolutas foram observadas nos períodos de 8, 12, 16 e 27 semanas, com quatro casos em cada grupo.

4.2. Tipos de hiperplasia ductal

Quanto ao padrão morfológico, foram identificadas quatro categorias principais de hiperplasia ductal: hiperplasia em placa com células basalóides, hiperplasia intraductal com formação de pontes, estratificação colunar e padrão adenomatóide.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, 14 amostras não apresentaram hiperplasia, enquanto 30 apresentaram algum dos padrões morfológicos avaliados.

A estratificação colunar foi o padrão mais frequente, sendo observada em 14 amostras. Em seguida, foram identificadas hiperplasia intraductal com formação de pontes em oito amostras, hiperplasia em placa com células basalóides em sete amostras e padrão adenomatóide em uma amostra.

4.3. Metaplasia ductal

A metaplasia ductal foi observada em 31 das 44 amostras (70,5%), enquanto 13 amostras (29,5%) não apresentaram essa alteração.

A distribuição dos casos variou entre os períodos de indução. Os grupos de 23 e 27 semanas apresentaram cinco casos de metaplasia cada, correspondendo às maiores frequências absolutas observadas.

Também foram identificados casos nos períodos de 8, 12, 16, 19, 22, 24, 28 e 30 semanas. Não foi observada metaplasia ductal nos grupos de 20, 25 e 26 semanas.

4.4. Tipos de metaplasia ductal

Na classificação dos tipos de metaplasia ductal, foram identificadas duas categorias: metaplasia de mucosa escamosa e outro padrão de metaplasia, conforme classificação apresentada na tabela.

Das 44 amostras avaliadas, 13 não apresentaram metaplasia, 24 apresentaram metaplasia de mucosa escamosa e sete apresentaram o outro padrão registrado.

A metaplasia de mucosa escamosa foi, portanto, o padrão predominante. Sua maior frequência foi observada no grupo de 27 semanas, no qual todas as cinco amostras apresentaram esse padrão.

4.5. Displasia ductal

A displasia ductal foi identificada em 19 das 44 amostras (43,2%), enquanto 25 (56,8%) não apresentaram essa alteração.

A distribuição dos casos variou de acordo com o período de indução. A maior frequência foi observada no grupo de 8 semanas, com quatro casos, seguido pelos grupos de 16, 19 e 20 semanas, com três, dois e dois casos, respectivamente.

Não foram observados casos de displasia nos períodos de 12, 25 e 26 semanas. Nos demais períodos foram identificados casos isolados ou em menor frequência.

4.6. Acúmulo de muco no ducto

O acúmulo de muco intraductal foi o achado mais frequente entre as alterações avaliadas, estando presente em 34 das 44 amostras (77,3%), enquanto 10 amostras (22,7%) não apresentaram esse achado.

A ocorrência foi observada em praticamente todos os períodos de indução. Os maiores números de casos foram identificados nos grupos de 23 e 27 semanas, com cinco casos em cada. Na sequência, os grupos de 16, 20, 24, 28 e 30 semanas apresentaram frequências menores.

Nos períodos de 25 e 26 semanas foi observado um caso em cada grupo.

DISCUSSÃO

O carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é o mais prevalente dentre os cânceres orais (SWAMINATHAN et al., 2024). O CCEO pode acometer lábio, dorso de língua, gengiva, palato duro e mole, mucosa jugal, assoalho de boca e outras regiões da boca. Sua distribuição geográfica e prevalência sofre grandes variações entre as diferentes populações (SARODE et al., 2020). Além disso, características individuais como sexo, local da lesão, aspecto clínico e diagnóstico histopatológico podem variar de acordo com hábitos, como o etilismo, o fumo e diferenças regionais (DAROIT et al., 2023). Quanto à localização anatômica, a língua é a região mais frequentemente acometida pelo câncer de boca (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

O presente estudo demonstrou elevada frequência de alterações histopatológicas nos ductos excretores das glândulas salivares menores linguais durante o processo de carcinogênese oral quimicamente induzida. Entre os 44 espécimes analisados, o acúmulo de muco intraductal foi o achado mais frequente, observado em 34 amostras (77,3%), seguido pela metaplasia ductal, identificada em 31 amostras (70,5%), e pela hiperplasia ductal, presente em 29 amostras (65,9%). A displasia ductal foi observada em 19 espécimes (43,2%).

A identificação de alterações proliferativas e metaplásicas em diferentes períodos de indução evidencia que os ductos excretores podem apresentar modificações morfológicas durante a evolução do processo carcinogênico. A presença de displasia ductal em 43,2% dos espécimes reforça a ocorrência de alterações celulares atípicas no epitélio ductal, embora os dados obtidos não permitam, isoladamente, estabelecer uma relação causal ou um mecanismo de propagação tumoral. Dessa forma, os achados sugerem a participação ou o envolvimento das estruturas ductais nas alterações teciduais que acompanham a carcinogênese oral induzida, ressaltando a necessidade de investigações adicionais sobre sua relação com a progressão do carcinoma epidermóide de língua.

Conclusão

CONCLUSÃO

Através do presente estudo, pode-se concluir que os ductos excretores das glândulas salivares menores linguais apresentaram frequentes alterações histopatológicas durante o processo de carcinogênese oral quimicamente induzida em ratos. A metaplasia e a hiperplasia ductal foram os achados mais frequentes, além da presença de displasia ductal em parte significativa dos espécimes. Esses resultados contribuem para ampliar o conhecimento acerca das modificações que acometem as estruturas ductais durante a carcinogênese oral e fornecem subsídios para futuras investigações sobre o papel dessas alterações na evolução e progressão das neoplasias malignas da língua.

Referências

BHOLA R, NARWAL A, KAMBOJ M, DEVI A, ANAND R, CHATTERJEE S. Histopathological evaluation of minor salivary gland aberrations in oral squamous cell carcinoma. J Cancer Res Ther. 2023 Jan-Mar;19(2):299-303. doi: 10.4103/jcrt.jcrt_1832_21.

BRYNE M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Dis. 1998 Jun;4(2):70-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.1998.tb00260.x. PMID: 9680893.

DANG RR, KIM J, QURESHI MM, FAZELI SR, ZHAO Q, NOONAN VL, SUNDARARAJAN D, SALAMA A, TRUONG MT. Impact of depth of invasion on local recurrence in R0 resected node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. Head Neck. 2023 Mar;45(3):561-566. doi: 10.1002/hed.27264.

HAY AJ, MIGLIACCI J, KARASSAWA ZANONI D, MCGILL M, PATEL S, GANLY I. Minor salivary gland tumors of the head and neck-Memorial Sloan Kettering experience: Incidence and outcomes by site and histological type. Cancer. 2019 Oct 1;125(19):3354-3366. doi: 10.1002/cncr.32208.

PARK SI, PARK W, CHOI S, JANG Y, KIM H, KIM SH, NOH JM, CHUNG MK, SON YI, BAEK CH, JEONG HS. Clinical Outcome of Minor Salivary Gland Cancers in the Oral Cavity: A Comparative Analysis With Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. Front Oncol. 2020 Jun 3;10:881. doi: 10.3389/fonc.2020.00881.

VERED M, DANIEL N, HIRSHBERG A, DAYAN D. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. Oral Oncol. 2003 Jul;39(5):491-6. doi: 10.1016/s1368-8375(03)00011-3.

SPEIGHT PM. Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. Head Neck Pathol. 2007 Sep;1(1):55-60. doi: 10.1007/s12105-007-0010-9. Epub 2007 Nov 30. PMID: 20614283; PMCID: PMC2807502.

SWAMINATHAN, Deepa et al. Factors associated with delay in diagnosis of oral cancers. Cancer Treatment and Research Communications, v. 40, 100831, 2024. DOI: 10.1016/j.ctarc.2024.100831.

CUFFARI L, TESSEROLI DE SIQUEIRA JT, NEMR K, RAPAPORT A. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics. 2006;102(1):56–61

FAN KH, WANG HM, KANG CJ, LEE LY, HUANG SF, LIN CY, CHEN EYC, CHEN IH, LIAO CT, CHANG JTC. Treatment Results of Postoperative Radiotherapy on Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Coexistence of Multiple Minor Risk Factors Results in Higher Recurrence Rates. International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics. 2010; 77(4): 1024-1029. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.06.064. INCA. Incidência de câncer no Brasil. 2018. Disponível em: . Acesso em: 02 jul. 2021.

KREPPEL M, NAZARLI P, GRANDOCH A, SAFI AF, ZIRK M, NICKENIG HJ, SCHEER M, ROTHAMEL D, HELLMICH M, ZÖLLER JE. Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma - Comparison of the prognostic significance. Oral Oncology. 2016; 60:68-73. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.07.004.

LUNA-ORTIZ K, GÜEMES-MEZA A, VILLAVICENCIO-VALENCIA V, MOSQUEDA-TAYLOR A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. Oral Oncol. 2004 Nov;40(10):992-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.04.013.

NI Y, YAP T, SILKE N, SILKE J, MCCULLOUGH M, CELENTANO A, O'REILLY LA. Loss of NF-kB1 and c-Rel accelerates oral carcinogenesis in mice. Oral Diseases. 2021; 27:168–172.

REYES M, FLORES T, BETANCUR D, PEÑA-OYARZÚN D , TORRES,VA. Wnt/β-Catenin Signaling in Oral Carcinogenesis. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21: 4682. doi:10.3390/ijms21134682.

RIVERA C. Essentials of oral cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2015;1;8(9):11884-11894.

SAWANT S, DONGRE H, KANOJIA D, JAMGHARE S, BORGES A, VAIDYA M. Role of Electron Microscopy in Early Detection of Altered Epithelium During Experimental Oral Carcinogenesis. Microscopy and Microanalysis. 2019; 25: 1367–1375. https://doi.org/10.1017/S1431927619000229.

SHANTI RM, O'MALLEY BW Jr. Surgical Management of Oral Cancer. Dental Clinics of North America. 2018; 62(1):77-86. https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.005.

SLOAN P, GALE N, HUNTER K et al. Malignant surface epithelial tumours: Squamous cell carcinoma. In: El-NAGGAR AK, CHAN JKC, GRANDIS JR, TAKATA T, SLOOTWEG PJ. WHO classification of tumours of the head and neck. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017. P.109-110

DA SILVA SOUTO AC, VIEIRA HEIMLICH F, LIMA DE OLIVEIRA L, BERGMANN A, DIAS FL, SPÍNDOLA ANTUNES H, DE MELO AC, THULER LCS, COHEN GOLDEMBERG D. Epidemiology of tongue squamous cell carcinoma: A retrospective cohort study. Oral Dis. 2023 Mar;29(2):402-410. doi: 10.1111/odi.13897.

SUPSAVHAD W, WESSEL P. DIRKSEN WP, MARTIN CK, ROSOL TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. The Veterinary Journal. 2016; 210: 7–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.006.

SUR S, STEELE R, AURORA R, VARVARES M, SCHWETYE KE, RAY RB. Bitter Melon prevents the development of 4-NQO-induced oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent mouse model by modulating immune signalling. Cancer Prevention Research. 2018; 11(4): 191–202. https://doi.org/10.1158/1940- 6207.

VIJAYAKUMAR G, SHARMA G, NARWAL A, KAMBOJ M. Broder versus Bryne's histologic grading parameters on incision biopsy specimens: A comparative study with P53 and KI67 expression. J Oral Maxillofac Pathol. 2021 Jan-Apr;25(1):55-60. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_328_20.

CÓDIGO: SB0530

AUTOR: LIVIAN MARIA SILVA DOS SANTOS

ORIENTADOR: MANUELA SALES LIMA NASCIMENTO

TÍTULO: Perfil Imunológico de Recém-Nascidos com Sífilis Congênita

Resumo

A sífilis congênita, causada pela bactéria espiroqueta Treponema pallidum, permanece como um importante problema de saúde pública, podendo ocasionar desfechos adversos em recém-nascidos (RN). Este estudo teve como objetivo analisar possíveis alterações hematológicas e imunológicas associadas à exposição à sífilis durante a gestação e à sífilis congênita, avaliando os leucócitos do sangue periférico de forma quantitativa, morfológica e imunofenotípica. Após obtenção do TCLE, foram incluídos 38 RNs, distribuídos em três grupos: controle (CT, n=14), sífilis exposta sem infecção congênita (SE, n=14) e sífilis congênita (SC, n=10). Foram analisados dados clínicos dos prontuários, esfregaços sanguíneos e imunofenotipagem por citometria de fluxo. A contagem diferencial e a avaliação morfológica identificaram aumento de eosinófilos nos grupos SE e SC em comparação ao CT, além de maior frequência de neutrófilos com granulação tóxica no grupo SC. A análise imunofenotípica demonstrou menores frequências de linfócitos T CD4+ e CD4+CD69+ no grupo SC em comparação ao CT. Os resultados evidenciam que a exposição à sífilis durante a gestação e, principalmente, a sífilis congênita estão associadas a alterações quantitativas, morfológicas e imunofenotípicas nos leucócitos de RNs. Esses achados contribuem para a compreensão dos efeitos da infecção no período neonatal e reforçam a importância do diagnóstico e acompanhamento desses neonatos.

Palavras-chave: Treponema pallidum; Sífilis Congênita; Imunidade Neonatal; Hematologia

TITLE: Immune Profile of Newborns with Congenital Syphilis

Abstract

Congenital syphilis, caused by the spirochete bacterium Treponema pallidum, remains an important public health concern and may lead to adverse outcomes in newborns (NBs). This study aimed to investigate potential hematological and immunological alterations associated with syphilis exposure during pregnancy and congenital syphilis by quantitatively, morphologically, and immunophenotypically assessing peripheral blood leukocytes. Following informed consent, 38 NBs were included and divided into three groups: control (CT, n=14), syphilis-exposed without congenital infection (SE, n=14), and congenital syphilis (CS, n=10). Clinical data from medical records, blood

smears, and flow cytometry-based immunophenotyping were analyzed. Differential leukocyte counts and morphological assessment identified increased eosinophil levels in the SE and CS groups compared with the CT group, as well as a higher frequency of neutrophils with toxic granulation in the CS group. Immunophenotypic analysis demonstrated lower frequencies of CD4+ and CD4+CD69+ T lymphocytes in the CS group compared with the CT group. These findings indicate that syphilis exposure during pregnancy and, particularly, congenital syphilis are associated with quantitative, morphological, and immunophenotypic alterations in leukocytes from NBs. These results contribute to a better understanding of the effects of syphilis infection during the neonatal period.

Keywords: Treponema pallidum; congenital syphilis; newborn immunity; hematology.

Introdução

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível causada pela bactéria espiroqueta *Treponema pallidum* (*T. pallidum*). Além da transmissão sexual, o patógeno pode ser transmitido verticalmente da gestante para o feto, por via transplacentária ou durante o parto, ocasionando a sífilis congênita (SC) (GHANEM; RAM; RICE, 2020; SANKARAN; PARTRIDGE; LAKSHMINRUSIMHA, 2023). A infecção fetal pode causar aborto espontâneo, prematuridade, natimorto e manifestações como hepatoesplenomegalia, alterações cutâneas, neurológicas, ósseas e dentárias, além de cegueira e surdez (EPPES; STAFFORD; RAC, 2022; RAC; STAFFORD; EPPES, 2020).

A SC permanece como importante problema de saúde pública. No Brasil, em 2024, foram registrados 9,6 casos por mil nascidos vivos e 183 óbitos relacionados à doença (BRASIL, 2025). No Rio Grande do Norte, entre 2013 e 2023, a incidência aumentou 113,5%, passando de 6,0 para 12,8 casos por mil nascidos vivos, valor superior à média nacional (SESAP-RN, 2024). Esse cenário reforça a necessidade de compreender os efeitos da infecção no organismo neonatal.

O T. pallidum apresenta mecanismos que favorecem sua disseminação e evasão imunológica. Embora possua dupla membrana, não apresenta lipopolissacarídeo (LPS), produzindo lipoproteínas capazes de estimular respostas inflamatórias por meio do receptor Toll-like 2 (TLR2) (RADOLF et al., 2016; LIEN et al., 1999). Sua motilidade facilita a invasão dos tecidos e a disseminação sistêmica, enquanto a baixa exposição de proteínas na membrana externa e a variação antigênica da proteína TprK dificultam o reconhecimento e a eliminação pelo sistema imune (LAFOND; LUKEHART, 2006; CENTURION-LARA et al., 1999).

A resposta imunológica à infecção envolve mecanismos inatos e adaptativos. Macrófagos e células dendríticas reconhecem componentes do *T. pallidum* e promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, recrutando leucócitos, incluindo neutrófilos, que atuam por fagocitose, degranulação e produção de espécies reativas de oxigênio (RADOLF et al., 1995; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). Na resposta adaptativa, células dendríticas apresentam antígenos aos linfócitos T, com destaque para os linfócitos T CD4+, que participam da resposta contra o patógeno por meio da

diferenciação em células Th1 e produção de IFN-γ, favorecendo a ativação de macrófagos. Linfócitos T CD8+ e células NK também contribuem para o controle da infecção (HAWLEY et al., 2017; MOORE et al., 2007; STARY et al., 2010; CRUZ et al., 2012).

Na sífilis congênita, essa resposta deve ser considerada diante da imaturidade funcional do sistema imune fetal e neonatal, que apresenta menor eficácia na resposta antígeno-específica (BAKER-ZANDER et al., 1985; CRUZ et al., 2012; SHIN et al., 2004). Além disso, a SC pode estar associada a alterações hematológicas, como anemia, trombocitopenia e alterações na contagem de leucócitos (LAGO; VACCARI; FIORI, 2013). Processos infecciosos também podem interferir na hematopoiese por meio de citocinas inflamatórias, estimulando a produção de células mieloides e modificando suas características morfológicas (ZARETSKY; ENGILES; HUNTER, 2014; BOETTCHER; MANZ, 2017). Alterações como granulação tóxica e hipersegmentação de neutrófilos podem ocorrer durante infecções bacterianas (SIPAHI; TAVIL; ÜNVER, 2002; AL-GWAIZ; BABAY, 2007).

Diante disso, considerando a capacidade do *T. pallidum* de induzir respostas inflamatórias e os efeitos das infecções sobre a hematopoiese e as células imunológicas circulantes, levanta-se a hipótese de que a sífilis congênita esteja associada a alterações morfológicas em células imunológicas do sangue periférico de recém-nascidos. Assim, investigar essas alterações pode contribuir para a compreensão dos impactos imunológicos e hematológicos da infecção no período neonatal.

Metodologia

O estudo caracteriza-se como observacional, transversal e quantitativo, com grupo controle, tendo como foco a análise comparativa de parâmetros celulares de recém-nascidos (RNs) com sífilis congênita ou expostos à sífilis. O recrutamento foi realizado na Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC), entre junho de 2025 e maio de 2026. A pesquisa seguiu a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, as diretrizes brasileiras para experimentação humana e a Declaração de Helsinque, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE 85291824.5.0000.5537). Os responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da coleta de dados e amostras.

Foram incluídos RNs da MEJC cujas mães apresentaram histórico de infecção por Treponema pallidum durante a gestação, independentemente do trimestre em que ocorreu a infecção ou da terapia recebida, além de RNs saudáveis para composição do grupo controle. Os participantes foram distribuídos em três grupos conforme o contexto clínico e a classificação do Ministério da Saúde: controle (CT), sífilis exposta sem infecção congênita (SE) e sífilis congênita (SC). Foram incluídos RNs com idade gestacional mínima de 32 semanas. Foram excluídos aqueles cujas mães apresentaram histórico de outras infecções durante a gestação, RNs com idade gestacional inferior a 32 semanas e participantes cujas mães tinham idade inferior a 18 anos.

As informações clínicas foram organizadas em tabelas contendo peso e comprimento ao nascer, sexo, idade gestacional, tipo de parto, classificação por percentil, testes rápidos

para sífilis, VDRL materno e neonatal, realização de tratamento adequado para sífilis e comorbidades maternas. Foram calculadas médias e porcentagens das variáveis. As comorbidades maternas também foram utilizadas para elaboração de um HeatMap. A classificação por percentil considerou o crescimento fetal e neonatal em relação a uma população de referência, permitindo classificar os RNs como adequados (AIG), pequenos (PIG) ou grandes (GIG) para a idade gestacional. O cálculo foi realizado por meio da ferramenta do projeto INTERGROWTH-21st, utilizando a relação entre peso e comprimento.

Para a análise hematológica, foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo EDTA, com volume médio de 1000 µL por indivíduo. Foram confeccionadas quatro lâminas por RN, utilizando 10 µL de sangue em cada lâmina. As lâminas foram coradas pelo método Panótico Rápido e analisadas em microscópio óptico com objetiva de 100× e óleo de imersão. Foi realizada a contagem diferencial de 100 leucócitos, considerando neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, bastões e basófilos. Também foram investigadas alterações morfológicas em 100 neutrófilos, 100 linfócitos e 10 eosinófilos, incluindo neutrófilos hipersegmentados, com granulação tóxica ou vacuolizados, linfócitos atípicos e eosinófilos trilobulados. As leituras foram realizadas com conhecimento do grupo ao qual cada amostra pertencia. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse 2000 equipado com câmera Axiocam 503 color e analisadas pelo software Zen Blue 3.13.

A caracterização imunofenotípica dos leucócitos foi realizada por citometria de fluxo utilizando 500 µL de sangue total de cada RN. As amostras passaram por lise de eritrócitos e posterior marcação com anticorpos. Foram utilizados dois métodos de lise: um tampão de lise preparado no laboratório, composto por bicarbonato de amônio, cloreto de amônio e água MilliQ, e o protocolo de lise inicial do kit QIAamp RNA Blood (QIAGEN), utilizando Buffer EL e PBS-BSA 1%. Após a lise, as células foram ressuspendidas em PBS-BSA 1% para a marcação.

Foram preparados três tubos para cada amostra: branco, painel 1 e painel 2. O tubo branco não recebeu anticorpos e foi utilizado como controle de autofluorescência. O painel 1, destinado à análise de linfócitos T, utilizou os marcadores CD8-FITC, CD69-PE, CD4-PECy7 e CD3-APC. O painel 2, destinado à avaliação de linfócitos T, B e NK, utilizou CD19-PE, CD56-BB700 e CD3-APC. Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz e mantidas no gelo. Posteriormente, foram lavadas com PBS 1× gelado, centrifugadas e ressuspendidas em 200 µL de PBS 1× gelado para análise no citômetro.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro BD C6 Accuri. Inicialmente, foi realizada a leitura do tubo branco para controle da autofluorescência. Foi estabelecido um threshold de 200 mil eventos, com aquisição média de 400 mil eventos por tubo. Os arquivos foram salvos em formato FCS (Flow Cytometry Standard) para posterior análise no software FlowJo.

No FlowJo, a estratégia de gating iniciou-se com o gráfico FSC-H × FSC-A para seleção de células únicas e exclusão de eventos indesejados. Em seguida, foi utilizado o gráfico SSC-A × FSC-H para delimitação da população celular de interesse. Os linfócitos foram identificados considerando tamanho celular e complexidade interna, relacionados aos parâmetros FSC (Forward Scatter) e SSC (Side Scatter). No painel 1,

após o isolamento da população linfocitária e seleção de células CD3+, foram analisadas as populações T CD4+ e T CD8+, além das células CD4+CD69+ e CD8+CD69+. O marcador CD69 foi utilizado para avaliar a ativação precoce dos linfócitos T. No painel 2, foram analisadas as populações de linfócitos B (CD3-CD19+) e NK (CD3-CD56+).

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8. Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro–Wilk, enquanto a identificação de valores discrepantes (outliers) foi realizada pelo teste ROUT, com Q = 1%. Conforme a distribuição dos dados, foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos. Para dados paramétricos, aplicou-se ANOVA de uma via, enquanto para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal–Wallis. O teste exato de Fisher foi empregado para avaliar possíveis associações

Resultados e Discussões

Este trabalho incluiu 38 participantes no total: 14 no grupo controle (CT), 14 no grupo sífilis exposta (SE) e 10 no grupo sífilis congênita (SC). A partir das informações clínicas dos prontuários (Tabela 3), obtiveram-se as médias de peso ao nascer para cada grupo, sendo 3 kg para o CT, 2,99 kg para o SE e 2,63 kg para o SC. O comprimento médio ao nascer foi de 46,5 cm para o CT, 47,08 cm para o SE e 45,5 cm para o SC. A idade gestacional ao nascer foi de aproximadamente 37 semanas no grupo CT, 38 semanas no SE e 36 semanas no SC. Nenhuma dessas características apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

A Tabela 3 também mostra que a maioria dos recém-nascidos era do sexo masculino nos grupos CT (57,2%) e SC (60%), enquanto o grupo SE teve uma divisão igual de 50% para cada sexo. O tipo de parto predominante foi o cesáreo, representando mais de 50% dos casos em todos os grupos. Quanto ao tamanho dos bebês (classificados pelo percentil de peso), a maioria apresentou peso adequado para a idade gestacional (AIG), com 50% no grupo CT, 92,8% no SE e 70% no grupo SC.

Os testes rápidos para sífilis em todos os recém-nascidos do grupo controle foram negativos, enquanto 100% dos bebês nos grupos sífilis exposta e sífilis congênita deram positivos (Tabela 3). Para o VDRL materno, 92,8% das mães do grupo SE e 100% das mães do grupo SC tiveram resultados reagentes. Já entre os recém-nascidos, o VDRL foi reagente em 78,6% no grupo SE e em 80% no grupo SC (Tabela 3). A presença de comorbidades maternas foi analisada para reduzir vieses na pesquisa: nos grupos controle e sífilis exposta, 57,1% das mães apresentavam alguma comorbidade, enquanto no grupo sífilis congênita esse valor ficou em 50% (Tabela 3). Dados não encontrados nos prontuários foram indicados na tabela pela sigla “N/A”.

Esses resultados contribuem para a literatura sobre a infecção por sífilis e permitem comparar os achados com o que já se sabe sobre outras doenças. É importante destacar como limitação do estudo o tamanho pequeno da amostra (N), o que pode influenciar nos resultados e conclusões. A análise dos dados clínicos mostrou que a infecção por sífilis não alterou o peso, o comprimento, a idade gestacional, o tipo de parto ou a

classificação por percentil dos recém-nascidos, pois as médias foram parecidas entre os três grupos.

Embora a sífilis costume estar associada a problemas na gravidez, como prematuridade e baixo peso ao nascer (DA SILVA FEITOSA; DA ROCHA; COSTA, 2016; HENZ, 2018), essas complicações não foram observadas neste estudo. Isso pode ter acontecido porque as mães do grupo exposto receberam tratamento adequado ou porque a infecção não estava em estágio avançado — hipótese reforçada pelo baixo número de bebês sintomáticos na amostra. Além disso, o baixo peso ao nascer costuma estar ligado a títulos altos de VDRL, o que também não foi visto de forma marcante neste estudo (NONATO; MELO; GUIMARÃES, 2015; ALVES; SOUZA; RIBEIRO, 2025).

Tabela 3 - Características clínicas gestacionais, perinatais e laboratoriais dos grupos estudados.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita; TR - teste rápido; NR - não reagente; R - reagente; VDRL - “Veneral Disease Research Laboratory”; N/A - não se aplica; CMB - comorbidade.

O teste de Fisher usado para avaliar o impacto das comorbidades não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$), confirmando que a presença de comorbidades nas mães não interferiu nos resultados do estudo.

As comorbidades maternas foram organizadas em um mapa de calor (HeatMap, Figura 4). A maioria das mães em todos os grupos não tinha comorbidades. A hipertensão (agrupando hipertensão arterial, gestacional, crônica e sistêmica) foi a condição mais comum entre as mães doentes: 28,57% no grupo CT, 21,43% no SE e 40% no SC. O diabetes mellitus gestacional veio em seguida, com 21,43% nos grupos CT e SE. Outros problemas como asma e anemia falciforme tiveram menor presença, assim como casos de mães com mais de uma doença ao mesmo tempo (hipertensão e diabetes, presente em uma mãe do grupo CT e uma do SE).

Figura 4 - Distribuição das comorbidades maternas referentes a cada grupo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita.

4.2 Contagem diferencial dos esfregaços sanguíneos

A contagem diferencial no sangue periférico mostrou a porcentagem de cada tipo de leucócito nos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos CT, SE e SC para os neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos (Figura 5). No entanto, foram encontradas diferenças significativas no número de eosinófilos e de bastões.

Para os eosinófilos, a diferença significativa ocorreu entre os grupos sífilis congênita e sífilis exposta, sendo que o grupo SC apresentou uma quantidade maior dessas células (Figura 5). Na literatura, existem relatos de eosinofilia na sífilis, principalmente em lesões de pele na fase secundária da doença (com mais de 200 eosinófilos por campo na análise de tecidos) e em lesões orais (ROSA; BENNETT; PILIANG, 2015; DE SOUZA et al., 2023; ELIAS et al., 2020).

Apesar desses relatos em lesões, outros estudos que analisaram o hemograma do sangue periférico não encontraram aumento de eosinófilos ou diferenças significativas nessa célula (CHAND et al., 2022; LEE et al., 2017). Nesses trabalhos, as principais alterações encontradas no sangue foram o aumento geral de leucócitos (com predomínio de linfócitos) e o aumento de monócitos na sífilis congênita.

Além disso, nosso grupo de pesquisa observou em dados ainda não publicados um aumento da citocina IL-4 no sangue de recém-nascidos com sífilis congênita. A IL-4 está ligada à resposta imune do tipo Th2, que ajuda a atrair, ativar e manter os eosinófilos vivos nos locais de inflamação. Isso ajuda a explicar o aumento de eosinófilos encontrado. Nosso grupo também já havia observado esse aumento de IL-4 em bebês infectados pelo vírus Zika, condição que foi associada a um maior risco de alergias no futuro (SALMERON et al., 2022). Juntos, esses dados indicam que infecções congênitas podem alterar o perfil imunológico do recém-nascido, favorecendo respostas do tipo Th2 e mudando a forma como o organismo responde no futuro.

Em relação aos bastões, houve um aumento no número dessas células nos grupos SE e SC em comparação ao grupo controle (Figura 5). Esse resultado era esperado porque esses grupos foram expostos à bactéria. Infecções estimulam a produção de leucócitos e causam o chamado “desvio à esquerda” no hemograma (aumento de células jovens como os bastões), mostrando que a medula óssea está trabalhando mais para combater a infecção (ROSENFELD, 2007; ARAÚJO, 2023). A sífilis congênita nem sempre causa esse tipo de alteração, mas há relatos na literatura de recém-nascidos com a doença que apresentaram desvio à esquerda com aumento de bastões (COSTA et al., 2024).

Figura 5 - Porcentagem das populações leucocitárias na contagem diferencial.

Fonte: Elaborado pelo autor com o GraphPad Prism 10 e ZEN Lite (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. A) porcentagem de neutrófilos segmentados; B) morfologia de neutrófilos segmentados; C) porcentagem de linfócitos; D) morfologia de linfócitos; E) porcentagem de monócitos; F) morfologia de monócitos; G) porcentagem de eosinófilos; H) morfologia de eosinófilos; I) porcentagem de bastões; J) morfologia de bastões. Valores de *$p < 0,05$ foram considerados para uma diferença significativa estatisticamente; nesse caso, ocorreu para os valores de eosinófilos e de bastões.

4.3 Identificação de alterações morfológicas leucocitárias nos esfregaços sanguíneos

A análise das alterações no formato das células focou em neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Nos neutrófilos, houve diferença significativa entre os grupos tanto para os neutrófilos segmentados comuns quanto para os neutrófilos com grânulos tóxicos (Figura 6).

O grupo sífilis congênita apresentou uma quantidade menor de neutrófilos segmentados comuns em comparação aos grupos controle e exposto. Por outro lado, teve um número significativamente maior de neutrófilos com grânulos tóxicos do que os grupos SE e CT (Figura 6).

Assim como os bastões, os neutrófilos com grânulos tóxicos aparecem em infecções bacterianas e inflamações graves. Eles refletem uma resposta intensa dos neutrófilos por

causa de toxinas ou agentes infecciosos (HOFFBRAND; MOSS, 2013; RODRIGUES, 2019; FAILACE; FERNANDES, 2015). Esse aumento concorda com a literatura e mostra que o sistema imune do recém-nascido está ativado contra a sífilis.

Nas outras células analisadas, alterações como linfócitos atípicos e eosinófilos trilobulados não mostraram diferenças significativas entre os três grupos (Figura 7). Portanto, a única mudança morfológica importante encontrada no estudo foi nos neutrófilos.

Figura 6 - Distribuição das alterações morfológicas dos neutrófilos em porcentagem.

Fonte: Elaborado pelo autor com o GraphPad Prism 10 e ZEN Lite (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. A) porcentagem de neutrófilos segmentados; B) morfologia de neutrófilos segmentados; C) porcentagem de neutrófilos vacuolizados; D) morfologia de neutrófilos vacuolizados; E) porcentagem de neutrófilos com granulações tóxicas; F) morfologia de neutrófilos com granulações tóxicas G) porcentagem de neutrófilos hipersegmentados; H) morfologia de neutrófilos hipersegmentados. Valores de *$p < 0,05$ foram considerados para uma diferença significativa estatisticamente; nesse caso, ocorreu para os valores de neutrófilos segmentados e para neutrófilos com granulações tóxicas.

Figura 7 - Distribuição das alterações morfológicas dos linfócitos e eosinófilos em porcentagem ou valor total.

Fonte: Elaborado pelo autor com o GraphPad Prism 10 e ZEN Lite (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. A) porcentagem de linfócitos típicos; B) morfologia de linfócitos típicos; C) porcentagem de linfócitos atípicos; D) morfologia de linfócitos atípicos; E) valor total de eosinófilos bilobulados; F) morfologia de eosinófilos bilobulados; G) valor total de eosinófilos trilobulados; H) morfologia de eosinófilos trilobulados. Valores de *$p < 0,05$ foram considerados para uma diferença significativa estatisticamente; nesse caso, não ocorreu para nenhum dos dados.

4.4 Imunofenotipagem

4.4.1 Painel 1 - Linfócitos T

A análise por dot plot (CD4xCD8) mostrou que as quantidades de linfócitos TCD4+ e TCD8+ foram muito parecidas entre os grupos. A média da porcentagem de TCD4+ foi de 85,1% no grupo CT, 77,2% no SE e 76,3% no SC. Para os linfócitos TCD8+, as médias foram de 10,2% no CT, 18,7% no SE e 19,2% no SC. O teste estatístico (ANOVA) confirmou que não houve diferença significativa entre os grupos para essas células ($p > 0,05$) (Figura 8B).

Por outro lado, quando analisamos os linfócitos TCD4+ ativados (marcados por CD69+), os grupos com sífilis apresentaram valores bem menores que o grupo controle (Figura 9). As médias foram de 14,1% no grupo CT, 4,4% no SE e apenas 0,06% no SC. O teste estatístico mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CT e SC, confirmando que o grupo controle tinha mais células TCD4+ ativadas.

Figura 8 - “Dot plot” para marcações CD4 x CD8.

Fonte: Elaborado pelo autor com o FlowJo (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. “Dot plot” com marcação para CD4 e CD8 dentro da população CD3+, para analisar a porcentagem de cada, CD4+ e CD8+, nos respectivos grupos do estudo (A); análise estatística realizada por ANOVA buscando diferença significativa, o qual não foi encontrada para essas relações (B) e (C).

Figura 9 - “Dot plot” para marcações CD4 x CD69.

Fonte: Elaborado pelo autor com o FlowJo (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. “Dot plot” com marcação para CD4 e CD69 dentro da população CD3+, para analisar a porcentagem de cada CD4+ e CD69+ nos respectivos grupos do estudo (A); análise estatística realizada por ANOVA buscando diferença significativa (B), o qual foi encontrada para essas relações entre os grupos CT e SC (*$p<0,05$).

Esses achados sugerem que a menor presença de CD69 nos bebês com sífilis congênita pode acontecer tanto pela imaturidade natural do sistema imune do recém-nascido quanto pela capacidade da bactéria T. pallidum de diminuir a ativação das células de defesa. Isso cria um ambiente menos inflamatório, o que pode facilitar a permanência da bactéria no organismo.

Como o sistema imune do recém-nascido já é imaturo, essa baixa ativação dos linfócitos TCD4+ pode prejudicar ainda mais a resposta do corpo, favorecendo o aumento da carga bacteriana e a espalhamento da infecção (BASHA; SURENDRAN; PICHICHERO, 2014; SEMMES et al., 2021). Essa diminuição na ativação pode levar a formas mais graves de sífilis congênita, aumentando o risco de prematuridade, aumento do fígado e do baço, anemia, queda nas plaquetas, feridas na pele, rinite, alterações nos ossos, problemas neurológicos e até morte do bebê (LESLIE et al., 2024).

Além disso, como os linfócitos TCD4+ ajudam a coordenar toda a resposta imune (ajudando macrófagos, produzindo citocinas, orientando os linfócitos B na produção de anticorpos e criando memória imunológica), essa falha na ativação pode prejudicar a defesa geral do corpo, aumentando o risco de outras infecções e diminuindo a resposta a vacinas (ZIMMERMANN; CURTIS, 2019; EISENBARTH et al., 2021).

Por fim, a análise dos linfócitos TCD8+ ativados (CD8+CD69+) mostrou médias de 2,03% no grupo CT, 4,8% no SE e 3,2% no SC (Figura 10). O teste estatístico não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), indicando que a infecção não alterou a ativação das células TCD8+.

Na literatura, um estudo com 17 recém-nascidos com sífilis congênita encontrou o mesmo resultado, sem diferenças na quantidade de células CD3+, CD4+ e CD8+ (SAMSON; BEATTY; MALAN, 2008). Porém, outro trabalho com 30 pacientes observou o contrário: uma diminuição nas porcentagens de linfócitos T CD3+ e CD4+ e um aumento nas células T CD8+ em comparação ao controle (WU, 2005).

Figura 10 - “Dot plot” para marcações CD8 x CD69.

Fonte: Elaborado pelo autor com o FlowJo (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. “Dot plot” com marcação para CD8 e CD69 dentro da população CD3+, para analisar a porcentagem de cada CD8+ e CD69+ nos respectivos grupos do estudo (A); análise estatística realizada por ANOVA buscando diferença significativa, o qual não foi encontrada para essas relações (B).

4.4.1 Painel 2 - Linfócitos T/B/NK

A análise do Painel 2 permitiu verificar a quantidade de linfócitos B (CD3-CD19+) e de células NK (CD3-CD56+). Para os linfócitos B, as médias das porcentagens foram de 6,7% no grupo CT, 9,4% no SE e 7,92% no SC (Figura 11). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$), mostrando que a infecção não alterou a quantidade dessas células no sangue.

Esse resultado é diferente do que costuma ser descrito na literatura, onde os linfócitos B aparecem aumentados na sífilis congênita. Tanto um estudo com 17 bebês quanto um relato de caso mostraram aumento no número de linfócitos B nos recém-nascidos infectados (SAMSON; BEATTY; MALAN, 2008; NAGAFUJI et al., 2026).

Figura 11 - “Dot plot” para marcações CD3 x CD19.

Fonte: Elaborado pelo autor com o FlowJo (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. “Dot plot” com marcação para CD3 e CD19 dentro dos linfócitos, para analisar a porcentagem de linfócitos B marcados por CD3-e CD19+ nos respectivos grupos do estudo (A); análise estatística realizada por ANOVA buscando diferença significativa, o qual não foi encontrada para essas relações (B).

Para as células NK, as médias foram de 1,7% no grupo CT, 2,28% no SE e 2,2% no SC (Figura 12). O teste estatístico também não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), indicando que a infecção não mudou a quantidade dessas células.

Embora estudos em adultos com sífilis mostrem redução de células NK e menor produção de IFN-γ (CRUZ et al., 2012), além de estratégias da bactéria para escapar dessas células (XU et al., 2024), a literatura mostra que bebês recém-nascidos naturalmente possuem mais células NK que os adultos, mas com capacidade de ataque bem menor (GUILMOT et al., 2011). Além disso, infecções graves ou sepse em recém-nascidos podem diminuir ainda mais a função dessas células (GEORGESON et al., 2001).

Assim, o fato de não termos encontrado diferenças no número de células NK não significa que elas estejam funcionando normalmente. É possível que a infecção altere a função e a capacidade de ataque dessas células, e não a sua quantidade no sangue.

Figura 12 - “Dot plot” para marcações CD3 x CD56.

Fonte: Elaborado pelo autor com o FlowJo (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita. “Dot plot” com marcação para CD3 e CD56 dentro dos linfócitos, para analisar a porcentagem de linfócitos NK marcados por CD3- e CD56+ nos respectivos grupos do estudo (A); análise estatística realizada por ANOVA buscando diferença significativa, o qual não foi encontrada para essas relações (B).

Conclusão

Em suma, este estudo comprovou que a sífilis congênita impacta diretamente o sistema imune neonatal. Recém-nascidos infectados pelo Treponema pallidum apresentaram alterações morfológicas nos leucócitos — evidenciadas pelo aumento de neutrófilos com granulações tóxicas —, além de contagens mais elevadas de bastões e eosinófilos quando comparados ao grupo hígido.

No perfil imunofenotípico, observou-se uma supressão da atividade dos linfócitos TCD4+ nos neonatos com a infecção, demonstrada pela redução do marcador de ativação inflamatória/infecciosa CD69. As populações de linfócitos TCD8+, linfócitos B e células NK, contudo, não sofreram alterações significativas. Painéis complementares de imunofenotipagem, direcionados a outras linhagens como os monócitos, podem futuramente elucidar novas vias desse impacto imunológico.

Portanto, resta clara a influência da sífilis congênita na resposta imune de recém-nascidos. Estes achados ampliam a compreensão sobre a patofisiologia da doença e abrem caminhos para pesquisas que possam otimizar o prognóstico e o acompanhamento do desenvolvimento desses pacientes.

Referências

ALVES, Lays Martins; SOUZA, Leandra Freitas De; RIBEIRO, Cristiano Drumond. Complicações relacionadas ao tratamento inadequado da sífilis gestacional para o desenvolvimento fetal: revisão da literatura. Revista JRG de Estudos Acadêmicos, [S. l.], v. 8, n. 18, p. e082268, 2025. DOI: 10.55892/jrg.v8i18.2268.

ARAÚJO, Fernanda Martins da Silva. Alterações no hemograma nas infecções virais e bacterianas: uma revisão de literatura. 2023. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) — Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

BASHA, Saleem; SURENDRAN, Naveen; PICHICHERO, Michael. Immune responses in neonates. Expert Review of Clinical Immunology, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1171–1184, 2014. DOI: 10.1586/1744666X.2014.942288.

CHAND, Arun Bahadur; BASNET, Ajaya; SHRESTHA, Lok Bahadur; SEN, Bindu; PRIYADARSHINEE, Anamika; AMATYA, Isha; RAJBANSHI, Bijendra Raj. Significance of Hematological Biomarkers in Association to Syphilitic Patients. Journal of Nepal Health Research Council, [S. l.], v. 20, n. 02, p. 426–430, 2022. DOI: 10.33314/jnhrc.v20i02.4074.

COSTA, CFG et al. SÍFILIS CONGÊNICA E REAÇÃO LEUCEMOIDE. Hematology, Transfusion and Cell Therapy, [S. l.], v. 46, p. S703, 2024. DOI: 10.1016/j.htct.2024.09.1180.

DA SILVA FEITOSA, José Antonio; DA ROCHA, Carlos Henrique Roriz; COSTA, Fernanda Salustiano. Artigo de revisão: sífilis congênita. Revista de Medicina e Saúde de Brasília, Brasília, v. 5, n. 2, 2016.

DE SOUZA, Vinícius Gonçalves; CARVALHO, Aparecida de Lourdes; ANGELONI, Mariana Bodini; SIQUEIRA MIRANDA, Carla Silva. Oral Eosinophil-Rich Syphilis: An Unusual Presentation. International Journal of Surgical Pathology, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 1119–1121, 2023. DOI: 10.1177/10668969221126106.

EISENBARTH, Stephanie C.; BAUMJOHANN, Dirk; CRAFT, Joe; FAZILLEAU, Nicolas; MA, Cindy S.; TANGYE, Stuart G.; VINUESA, Carola G.; LINTERMAN, Michelle A. CD4+ T cells that help B cells – a proposal for uniform nomenclature. Trends in Immunology, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 658–669, 2021. DOI: 10.1016/j.it.2021.06.003.

ELIAS, Anthony; WARK, Kirsty; SLAPE, Dana; COOK, David; LEE, Kenneth; MCKEW, Genevieve. Secondary Syphilis with Eosinophilia Complicated by Severe Jarisch–Herxheimer Reaction. Case Reports in Infectious Diseases, [S. l.], v. 2020, p. 1–5, 2020. DOI: 10.1155/2020/2150314.

FAILACE, Renato; FERNANDES, Flavio. Hemograma: manual de interpretação. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

GEORGESON, George D.; SZŐNY, Barnabás J.; STREITMAN, Károly; KOVÁCS, Attila; KOVÁCS, László; LÁSZLÓ, Aranka. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. European Journal of Pediatrics, [S. l.], v. 160, n. 8, p. 478–482, 2001. DOI: 10.1007/s004310100773.

GUILMOT, Aline; HERMANN, Emmanuel; BRAUD, Véronique M.; CARLIER, Yves; TRUYENS, Carine. Natural Killer Cell Responses to Infections in Early Life. Journal of Innate Immunity, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 280–288, 2011. DOI: 10.1159/000323934.

HENZ, Camila. Sífilis na gestação e desfechos adversos. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia) — Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018. Disponível em:https://lume.ufrgs.br/handle/10183/188962. Acesso em: 26 maio 2026.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Fundamentos em hematologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

LEE, Tiffany; BELL, Stephanie; SCIMEME, Jason; MARAQA, Nizar. Congenital Syphilis Masquerading as Leukemia. American Journal of Perinatology Reports, [S. l.], v. 07, n. 03, p. e167–e170, 2017. DOI: 10.1055/s-0037-1603955.

LESLIE, S. W.; VAIDYA, R. Congenital and Maternal Syphilis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Atualizado em: 17 ago. 2024. PMID: 30725772. Disponível em:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537087/. Acesso em: 23 jun. 2026.

NAGAFUJI, Motomichi et al. Time Course of the Immune Response in a Preterm Infant With Congenital Syphilis Following Incomplete Maternal Treatment: A Case Report. Pediatric Infectious Disease Journal, [S. l.], 2026. DOI: 10.1097/INF.0000000000005230.

NONATO, Solange Maria; MELO, Ana Paula Souto; GUIMARÃES, Mark Drew Crosland. Sífilis na gestação e fatores associados à sífilis congênita em Belo Horizonte-MG, 2010-2013. Epidemiologia e Serviços de Saúde, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 681–694, 2015. DOI: 10.5123/S1679-49742015000400010.

RODRIGUES, Adriana Dalpicolli. Hematologia básica. 2. ed. Porto Alegre: SADAH, 2019.

ROSA, Gabriela; BENNETT, Dan; PILIANG, Melissa P. Eosinophil-rich syphilis: a report of four cases. Journal of Cutaneous Pathology, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 554–558, 2015. DOI: 10.1111/cup.12540.

ROSENFELD, Ricardo. Fundamentos do hemograma: do laboratório à clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SALMERON, Amanda Costa Ayres et al. Immunological imbalance in microcephalic children with congenital Zika virus syndrome. Medical Microbiology and Immunology, [S. l.], v. 211, n. 5–6, p. 219–235, 2022. DOI: 10.1007/s00430-022-00746-5.

SAMSON, G. R.; BEATTY, D. W.; MALAN, A. F. Immune studies in infants with congenital syphilis. Clinical and Experimental Immunology, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 315–318, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1990.tb03337.x.

SEMMES, Eleanor C.; CHEN, Jui-Lin; GOSWAMI, Ria; BURT, Trevor D.; PERMAR, Sallie R.; FOUDA, Genevieve G. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. Frontiers in Immunology, [S. l.], v. 11, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595297.

WU, Zhi-hua. Examination and clinical effect of serum interleukin-6, interleukin-8 and T-cell subset in newborns with congenital syphilis. Chinese Journal of Dermatovenereology of Integrated Traditional and Western Medicine, 2005. Disponível em:https://www.semanticscholar.org/. Acesso em: 8 jun. 2026.

XU, Qiu-Yan; ZHENG, Xin-Qi; YE, Wei-Ming; YI, Dong-Yu; LI, Ze; MENG, Qing-Qi; TONG, Man-Li; LIU, Dan; YANG, Tian-Ci. Platelet-derived major histocompatibility complex class I coating on Treponema pallidum attenuates natural killer cell lethality. Virulence, [S. l.], v. 15, n. 1, 2024. DOI: 10.1080/21505594.2024.2350892.

ZIMMERMANN, Petra; CURTIS, Nigel. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. Clinical Microbiology Reviews, [S. l.], v. 32, n. 2, 2019. DOI: 10.1128/CMR.00084-18.

Anexos



Figura 1 - desenho experimental: elaborado pelo autor com BioRender (2026). CT - controle; SE - sífilis exposta; SC - sífilis congênita; TR - teste rápido; NR - não reagente; R - reagente; VDRL - “Veneral Disease Research Laboratory”.



Figura - comorbidades maternas



contagem diferencial



alterações morfológicas



outras alterações



estratégia de gate painel 1



cd4xcd8



cd4xcd69



cd8xcd69



estratégia de gate painel 2



cd3xcd19



cd3xcd56



conclusões

CÓDIGO: SB0536

AUTOR: ARTHUR HENRIQUE DANTAS DE AZEVEDO

ORIENTADOR: JOAO PAULO MATOS SANTOS LIMA

TÍTULO: Análise comparativa de ferramentas computacionais de trajetória molecular e exploração do espaço conformacional dinâmico de quitinases ortólogas e isoformas.

Resumo

As quitinases são enzimas essenciais para a remodelação da parede celular e sobrevivência de fungos do gênero Cryptococcus. A compreensão de sua dinâmica conformacional é fundamental para entender sua função biológica, contudo, a escolha da ferramenta de dinâmica molecular (DM) pode influenciar significativamente a interpretação dos resultados. Este estudo realizou uma análise comparativa de três ferramentas computacionais de DM — NMSim, RoC e BioEmu — utilizando 20 quitinases (ortólogas e isoformas) como modelo biomolecular. Os resultados demonstraram disparidades metodológicas significativas: o NMSim apresentou a maior flexibilidade estrutural, o RoC exibiu alta estabilidade e conservação, enquanto o BioEmu demonstrou um comportamento dinâmico intermediário. Biologicamente, observou-se que quitinases ortólogas compartilham o mesmo espaço conformacional, evidenciando uma conservação dinâmica evolutiva necessária para a preservação da atividade catalítica. Em contrapartida, as análises evidenciaram que isoformas e enzimas pertencentes a gêneros distintos exploram espaços conformacionais independentes. Em última análise, evidencia-se que o distanciamento filogenético e o surgimento de isoformas atuam como moduladores diretos da flexibilidade estrutural dessas enzimas. Além disso, o estudo elucida as particularidades preditivas de três ferramentas de DM, utilizando o RMSD e RMSF das simulações para balizar suas diferenças analíticas.

Palavras-chave: Quitinases. Ortólogas. Isoformas. Dinâmica Molecular. RMSD. RMSF. PCA.

TITLE: Comparative analysis of computational molecular trajectory tools and exploration of the dynamic conformational space of orthologous chitinases and isoforms.

Abstract

Chitinases are essential enzymes for cell wall remodeling and the survival of fungi of the genus Cryptococcus. Understanding their conformational dynamics is fundamental

to elucidating their biological function; however, the choice of molecular dynamics (MD) tool can significantly influence the interpretation of results. This study conducted a comparative analysis of three computational MD tools—NMSim, RoC, and BioEmu—using 20 chitinases (orthologs and isoforms) as biomolecular models. The results demonstrated significant methodological disparities: NMSim showed the greatest structural flexibility, RoC exhibited high stability and conservation, while BioEmu displayed intermediate dynamic behavior. Biologically, it was observed that orthologous chitinases share the same conformational space, evidencing an evolutionary dynamic conservation necessary for the preservation of catalytic activity. In contrast, analyses revealed that isoforms and enzymes belonging to distinct genera explore independent conformational spaces. Ultimately, it is evident that phylogenetic distancing and the emergence of isoforms act as direct modulators of the structural flexibility of these enzymes. Furthermore, the study elucidates the predictive particularities of three MD tools, utilizing the RMSD and RMSF from the simulations to delineate their analytical differences.

Keywords: Chitinases. Orthologs. Isoforms. Molecular Dynamics. RMSD. RMSF. PCA.

Introdução

As quitinases são enzimas responsáveis pela degradação de quitina (HARTL et al., 2012), um polissacarídeo que consiste em monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) conectados por ligações glicosídicas do tipo β-(1→4) encontrado em carapaças de crustáceos, exoesqueletos de insetos, cutículas de invertebrados e paredes celulares de fungos (ZHANG et al., 2021). Em células fúngicas, as quitinases atuam em conjunto com as quitina sintases, enzimas que atuam na síntese de quitina (RONCERO, 2002), contribuindo para a remodelagem desse polissacarídeo estrutural (MARBÁN-GONZÁLEZ et al., 2021), um processo substancial para a sobrevivência do fungo. No gênero Cryptococcus, que engloba patógenos relacionados à criptococose — uma micose sistêmica e oportunista que se dissemina dos pulmões para o sistema nervoso central (BERGUSON et al., 2022) —, a dinâmica da parede celular assume um papel ainda mais crítico: além de atuarem na clivagem de quitina, as quitinases são importantes para a manutenção da plasticidade da parede celular e possuem um papel na maturação sexual (BAKER et al., 2009). Portanto, a regulação precisa e a manutenção da estabilidade conformacional dessas enzimas são determinantes para a sobrevivência e viabilidade de Cryptococcus spp.

Genes ortólogos são sequências de DNA pertencentes a espécies diferentes que se originaram do mesmo gene ancestral comum em decorrência de eventos de especiação, tendendo, em sua grande maioria, a conservar a mesma função biológica estrutural ou catalítica ao longo da evolução (GABALDÓN et al., 2018). Por outro lado, as isoformas representam a diversidade proteica encontrada em um único organismo, que surgem do processamento variado do RNA mensageiro (mRNA) em decorrência de mecanismos regulatórios complexos. Dentre os principais processos responsáveis pela geração dessas isoformas, destaca-se a utilização de sítios alternativos de início da transcrição, o splicing alternativo de RNAs mensageiros precursores, a terminação alternativa da transcrição e a seleção de sítios alternativos de poliadenilação (SHILA et al., 2025). Em conjunto, esses mecanismos conferem uma ampla plasticidade transcricional,

permitindo que uma única sequência genômica dê origem a múltiplas moléculas com potenciais funcionais distintos, podendo conferir adaptação a diferentes microambientes, exigências fisiológicas ou estágios do ciclo celular (SHILA et al., 2025).

Simulações de dinâmica molecular (DM) estão entre as técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de proteínas, pois a DM revela informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, tempo-dependente, dos átomos individuais que compõem a macromolécula (NAMBA et al., 2008). Entretanto, as plataformas disponíveis na atualidade para a execução desse tipo de análise empregam metodologias preditivas ligeiramente distintas, o que, se não for bem compreendido, pode enviesar a interpretação dos resultados. Dessa forma, este projeto de pesquisa reuniu um conjunto de quitinases do gênero Cryptococcus com um duplo propósito: avaliar o perfil de exploração do espaço conformacional dinâmico entre ortólogas e isoformas e evidenciar as disparidades analíticas entre três diferentes métodos computacionais de DM (NMSim, RoC e BioEmu). Nesse contexto, as quitinases foram utilizadas como um modelo biomolecular comparativo para diferenciar a sensibilidade dessas ferramentas preditivas, demonstrando na prática como cada metodologia impacta significativamente os resultados de desvio (RMSD - Root Mean Square Deviation) e flutuação (RMSF - Root Mean Square Fluctuation) em simulações de DM.

Metodologia

Seleção e Agrupamento das Quitinases

Para a identificação e seleção das quitinases, utilizou-se a ferramenta de busca computacional Protein BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), utilizando como sequências-alvo quatro quitinases de Cryptococcus neoformans previamente avaliadas em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa. No total, 20 quitinases foram selecionadas e distribuídas em quatro grupos de ortólogas, cada um com cinco proteínas, e três grupos de isoformas pertencentes às espécies C. neoformans, C. bacillisporus e C. gattii. Com o intuito de validar a legitimidade do agrupamento dessas sequências, procedeu-se à análise filogenética utilizando o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR et al., 2024). A construção da árvore filogenética evidenciou que as relações evolutivas estabelecidas entre as 20 proteínas escolhidas corroboram a separação e o agrupamento realizados na etapa de busca inicial. Por fim, visando consolidar ainda mais essas relações evolutivas e validar de forma robusta a classificação entre ortólogas e isoformas, as sequências proteicas foram submetidas a um alinhamento múltiplo no ambiente do MEGA, empregando-se o algoritmo MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (EDGAR, 2004).

Modelagem das Proteínas

No que diz respeito à predição da estrutura tridimensional das quitinases, foi empregado o modelo de inteligência artificial AlphaFold 3 (ABRAMSON et al., 2024) para a geração dos modelos iniciais, e ferramentas como SignalP 6.0 (TEUFEL et al., 2022), DeepTMHMM (HALLGREN et al., 2022), DeepLoc 2.1 (ØDUM et al., 2024) e

RevelioPlots (FERNANDES et al., 2026) para a otimização das sequências, já que todas elas apresentavam motivos periféricos com baixo pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) correspondentes a regiões de peptídeo sinal ou partes transmembrana, segmentos que são clivados no processamento pós-traducional e não compõem a forma final das quitinases. Tendo em vista isso, novos modelos foram gerados por meio do AlphaFold 3 com essas modificações na sequência, objetivando fazer uso da forma ativa das enzimas para as análises subsequentes.

Simulações de DM

No que tange à obtenção das trajetórias conformacionais, as simulações de DM foram executadas a partir dos modelos tridimensionais estáticos gerados e otimizados na etapa anterior. Para esse propósito, foram empregadas três ferramentas computacionais distintas: NMSim (KRÜGER et al., 2012), The Room of Conformations (RoC) (EvoMol-Lab, 2025) e BioEmu (LEWIS et al., 2025). A utilização simultânea desses softwares serviu para, além de gerar os perfis dinâmicos para as 20 quitinases selecionadas, consolidar uma base de dados empírica que viabilizasse a avaliação do contraste do comportamento preditivo de cada uma dessas metodologias de simulação.

Gráficos de RMSD e RMSF

A partir dos dados de RMSD e RMSF referentes às simulações de DM, utilizou-se o HufflePlots (EvoMol-Lab, 2024) para comparar, por meio de gráficos, o comportamento dos grupos de ortólogas e isoformas quanto a essas métricas. Ademais, essa análise auxiliou a fundamentar tanto a diferenciação técnica como a comparação de desempenho entre as três ferramentas de DM empregadas neste estudo.

Análise de Componentes Principais (PCA)

Para a caracterização do espaço conformacional dinâmico ocupado pelos grupos de enzimas, conduziram-se análises de PCA mediante o EvoEmu (LIMA, 2026). Em caráter complementar, analisou-se a projeção espacial de dois pares de quitinases, um com duas proteínas pertencentes ao mesmo gênero (Cryptococcus) localizados na mesma família (Cryptococcaceae) e outro com quitinases derivadas de gêneros diferentes pertencentes à família Cryptococcaceae (Cryptococcus e Kwoniella).

Resultados e Discussões

Comparação das Ferramentas Computacionais de DM

A avaliação comparativa das trajetórias geradas por NMSim, RoC e BioEmu revelou divergências metodológicas substanciais, quantificadas de forma expressiva pelos perfis de RMSD e RMSF. A análise dos valores médios globais (em ångström) evidenciou que o NMSim apresentou a maior variabilidade estrutural, com RMSD e RMSF médios de 3,10 e 5,58, respectivamente (Figura 1A). Em contrapartida, o RoC exibiu os menores índices para ambas as métricas (RMSD médio de 1,40 e RMSF de 0,84). O BioEmu,

por sua vez, demonstrou um comportamento intermediário, registrando 2,22 para o RMSD e 1,25 para o RMSF.

Esses valores delineiam perfis dinâmicos intrínsecos a cada metodologia. O NMSim, ao registrar os maiores índices globais e locais, indica uma ampla exploração conformacional, na qual a estrutura se afasta significativamente de seu estado inicial enquanto os resíduos mantêm alta liberdade de movimentação. Em nítido contraste, os baixos desvios do RoC sugerem uma notável estabilidade, conservando rigidamente o enovelamento global da proteína e restringindo a flutuação local dos aminoácidos. O BioEmu atua como um modelo de transição: o desvio global intermediário combinado a flutuações locais mais contidas sugere uma flexibilidade de "corpo rígido", um cenário em que domínios estruturais inteiros se deslocam em bloco, sem sofrerem grandes deformações internas.

A avaliação do desvio padrão médio — métrica que reflete o grau de dispersão e variação intra-trajetória (valores maiores refletem menor similaridade) — corroborou esses perfis. O NMSim apresentou os maiores índices (1,02 para RMSD e 2,34 para RMSF) (Figura 1B), traduzindo uma flexibilidade estrutural ampla que chega a contrastar com a conservação evolutiva esperada. O RoC exibiu os menores valores (0,26 e 0,20), denotando um comportamento uniformemente estável e altamente conservado em todas as simulações, ao passo que o BioEmu confirmou seu caráter intermediário (0,88 e 0,46, respectivamente). No que tange aos agrupamentos biológicos, essa tendência de variabilidade (NMSim > BioEmu > RoC) manteve-se consistente nas análises de RMSD médio e seu respectivo desvio padrão (Figuras 2A e 2B). É digno de nota, entretanto, que na investigação das flutuações locais (RMSF), o BioEmu apresentou um comportamento mais análogo à estabilidade restrita do RoC, distanciando-se do perfil oscilatório do NMSim (Figuras 2C e 2D).

Do ponto de vista algorítmico, essas discrepâncias são justificadas pela natureza preditiva de cada plataforma. O NMSim opera sob uma lógica interpolativa fundamentada em transições geométricas entre dois estados predefinidos (inicial e final). Sob a ótica de uma análise de transição, ele posiciona cada estado em uma extremidade do eixo X e calcula as conformações intermediárias que preenchem esse intervalo. Em síntese, o NMSim gera trajetórias sequenciais e rotas de transição geométrica entre dois modelos definidos. Assim, o objetivo é descrever o "caminho" físico da proteína, resultando em um gráfico de RMSD progressivo que representa o deslocamento mecânico contínuo necessário para conectar esses dois pontos de referência (Figura 3A). Em oposição, RoC e BioEmu produzem uma distribuição de equilíbrio termodinâmico por meio da amostragem estocástica de conformações. Em vez de gerar uma rota linear, eles utilizam modelos de difusão para gerar amostras estruturais de forma estatisticamente independente, mapeando a diversidade conformacional ao redor de uma média. O objetivo é prever a probabilidade de diferentes estados e flutuações energéticas, o que gera um gráfico de RMSD oscilatório e "espinhado" (Figuras 3B e 3C). Essa saída não busca ligar dois extremos sequencialmente, ela almeja representar a "nuvem" de estruturas energeticamente plausíveis e a real diversidade conformacional que a proteína pode assumir enquanto permanece em equilíbrio.

Análises de Espaço Conformacional

A princípio, os resultados obtidos demonstraram que as quitinases ortólogas compartilham, em sua maioria, o mesmo espaço conformacional ao longo do tempo, fato que sugere uma forte conservação do comportamento dinâmico interespécies (Figura 4A – pca de cinco quitinases do grupo 1). Em contrapartida, a comparação de isoformas revelou um perfil contrastante. As análises de PCA evidenciaram que as isoformas não exploram o mesmo espaço conformacional, segregando-se em perfis dinâmicos distintos (Figura 4B). Essa divergência intraespécie sugere que, embora pertençam ao mesmo organismo, as pequenas variações em suas sequências são suficientes para alterar o comportamento flexível da proteína.

Adicionalmente, as avaliações taxonômicas corroboraram essas observações. Identificou-se que quitinases restritas ao mesmo gênero (Cryptococcus) apresentam forte sobreposição espacial, mantendo uma assinatura dinâmica consolidada durante a especiação (Figura 5A). Em oposição anatômica, a comparação estrutural entre quitinases pertencentes à mesma família evolutiva (Cryptococcaceae), porém de gêneros distintos (Cryptococcus e Kwoniella), evidenciou a exploração de espaços conformacionais diametralmente independentes (Figura 5B). Em suma, esses dados indicam que a distância filogenética (como a separação entre gêneros) e a especialização intraespécie (como a geração de isoformas) ditam reconfigurações significativas na dinâmica da proteína.

Conclusão

Em síntese, o presente estudo evidencia que a exploração do espaço conformacional é indispensável para a compreensão evolutiva e funcional de macromoléculas, e que a interpretação desses fenômenos biológicos é condicionada à ferramenta computacional utilizada para a simulação de DM.

Nessa perspectiva, a análise comparativa de desempenho metodológico demonstrou disparidades operacionais e analíticas marcantes entre as ferramentas computacionais de DM avaliadas. O NMSim, pautado em uma mecânica interpolativa para estabelecer rotas de transição geométrica, expôs perfis de alta flexibilidade e amplos desvios estruturais. Em contrapartida, as aplicações RoC e BioEmu, fundamentadas na amostragem estocástica de equilíbrios termodinâmicos, apresentaram maior conservação do enovelamento. O RoC caracterizou-se por uma extrema restrição e estabilidade global, enquanto o BioEmu assumiu um perfil dinâmico intermediário, análogo a movimentações de corpo rígido. Tais divergências concluem que a escolha do software não é trivial e deve ser rigorosamente alinhada ao escopo do trabalho.

Sob a ótica biofísica e evolutiva, a investigação validou a premissa de que as pressões filogenéticas modulam diretamente a dinâmica das proteínas. A notável sobreposição do espaço conformacional entre as quitinases ortólogas e entre enzimas restritas ao mesmo gênero (Cryptococcus) confirma a rigorosa conservação interespécies da assinatura dinâmica, um requisito vital para a preservação da atividade catalítica ancestral. Em contraste direto com esse paradigma de conservação, a evidente segregação espacial identificada nas isoformas revela que variações transcricionais e sequenciais mínimas intraespécie são suficientes para reconfigurar o comportamento flexível da proteína, o

que sugere a ocorrência de especializações funcionais e adaptativas no microambiente celular. Por fim, a constatação de que gêneros distintos de uma mesma família exploram espaços diametralmente independentes consolida a tese de que a distância evolutiva dita grandes reconfigurações dinâmicas.

Portanto, conclui-se que a evolução e a formação de isoformas são fatores que reconfiguram diretamente a dinâmica das quitinases. Ademais, o estudo também expande a compreensão acerca de três ferramentas computacionais de simulação de DM (NMSim, RoC e BioEmu), evidenciando suas principais diferenças metodológicas com base nos dados de RMSD e RMSF das simulações.

Referências

Zhang, X.; Yuan, J.; Li, F.; Xiang, J. Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. Mar. Drugs 2021, 19, 153. https://doi.org/10.3390/md19030153.

RONCERO, C. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. Current genetics, 41(6), 367-378, 2002.

Marbán-González A, Hernández-Mendoza A, Ordóñez M, Razo-Hernández RS, Viveros-Ceballos JL. Discovery of Octahydroisoindolone as a Scaffold for the Selective Inhibition of Chitinase B1 from Aspergillus fumigatus: In Silico Drug Design Studies. Molecules. 2021 Dec 15;26(24):7606. doi: 10.3390/molecules26247606. PMID: 34946697; PMCID: PMC8705689.

Baker LG, Specht CA, Lodge JK. Chitinases are essential for sexual development but not vegetative growth in Cryptococcus neoformans. Eukaryot Cell. 2009 Nov;8(11):1692-705. doi: 10.1128/EC.00227-09. Epub 2009 Sep 4. PMID: 19734369; PMCID: PMC2772403.

Berguson HP, Caulfield LW, Price MS. Influence of Pathogen Carbon Metabolism on Interactions With Host Immunity. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Mar 17;12:861405. doi: 10.3389/fcimb.2022.861405. PMID: 35372116; PMCID: PMC8968422.

Gabaldón T, Koonin EV. Functional and evolutionary implications of gene orthology. Nat Rev Genet. 2013 May;14(5):360-6. doi: 10.1038/nrg3456. Epub 2013 Apr 4. PMID: 23552219; PMCID: PMC5877793.

Shila S, Dahiya V, Hisle C, Bahadursingh E, Thiyagarajan R, Fields PE, Rumi MAK. mRNA Isoforms and Variants in Health and Disease. Int J Mol Sci. 2025 Sep 25;26(19):9356. doi: 10.3390/ijms26199356. PMID: 41096623; PMCID: PMC12524470.

Namba, A. M., da Silva, V. B., & da Silva, C. H. T. P. (2008). Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. Eclética Química, 33(4).

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3), 403–410.

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive and green computing. Molecular Biology and Evolution, 41, 1-9.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

Abramson, J., Adler, J., Dunger, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature 630, 493–500 (2024). https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w.

TEUFEL, F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. Nature Biotechnology, v. 40, n. 7, p. 1023–1025, 2022. DOI: 10.1038/s41587-021-01156-3.

Hallgren, J., et al. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. bioRxiv. DOI: 10.1101/2022.04.08.487609.

Ødum, M. T., Teufel, F., Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Winther, O., & Nielsen, H. (2024). DeepLoc 2.1: multi-label membrane protein type prediction using protein language models. Nucleic Acids Research, 52(W1), W215–W220. DOI: 10.1093/nar/gkae237.

Fernandes, L. L. S., Azevedo, A. H. D., França, J. V. S., & Lima, J. P. M. S. (2026). RevelioPlots: An Interactive Web Application for Fast AI-Based Protein Models Quality Assessment. bioRxiv. https://doi.org/10.64898/2026.02.23.707401.

Krüger DM, Ahmed A, Gohlke H. NMSim web server: integrated approach for normal mode-based geometric simulations of biologically relevant conformational transitions in proteins. Nucleic Acids Res. 2012 Jul;40(Web Server issue):W310-6. doi: 10.1093/nar/gks478. Epub 2012 Jun 4. PMID: 22669906; PMCID: PMC3394247.

EvoMol-Lab. (2025). RoC: The Room of Conformations (Versão 1.0) [Software de computador]. GitHub. https://github.com/evomol-lab/RoC.

Bakan, A, Meireles, LM, Bahar, I. (2011) ProDy: Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments. Bioinformatics 27(11):1575-1577.

R. J. Gowers, M. Linke, J. Barnoud, T. J. E. Reddy, M. N. Melo, S. L. Seyler, D. L. Dotson, J. Domanski, S. Buchoux, I. M. Kenney, and O. Beckstein. MDAnalysis: A Python package for the rapid analysis of molecular dynamics simulations. In S. Benthall and S. Rostrup, editors, Proceedings of the 15th Python in Science Conference, pages 98-105, Austin, TX, 2016. SciPy.

Sarah Lewis et al., Scalable emulation of protein equilibrium ensembles with generative deep learning. Science 389, eadv9817 (2025). DOI: 10.1126/science.adv9817.

EvoMol-Lab. (2024). HufflePlots [Software de computador]. GitHub. https://github.com/evomol-lab/HufflePlots.

Lima, J. P. M. S. (2026). EvoEmu [Software de computador]. GitHub. https://github.com/jpmslima/EvoEmu.

Anexos



Comparação de ferramentas computacionais de dinâmica molecular (DM). (A) Valores médios de RMSD e RMSF (em Å) para as ferramentas NMSim, RoC e BioEmu. (B) Desvio padrão médio das métricas, indicando a variabilidade e a dispersão dos dados.



Comparação do desempenho dinâmico entre grupos de quitinases ortólogas e isoformas para cada ferramenta computacional de DM. (A) Valores médios de RMSD. (B) Valores médios de RMSF. (C) Desvio padrão médio do RMSD. (D) Desvio padrão médio do RMSF.



Análises de RMSD das trajetórias de quitinases ortólogas. (A) Gráfico de RMSD gerado pelo HufflePlots, a partir de uma simulação de DM obtida pelo NMSim. (B) e (C) Gráficos gerados pelo HufflePlots, advindo de simulações compiladas por RoC e BioEmu.



Análises de Componentes Principais (PCA) que evidenciam o espaço conformacional dinâmico ocupado por quitinases ortólogas e isoformas. (A) Análise de PCA de cinco quitinases ortólogas. (B) Análise de PCA de quatro isoformas de C. neoformans.



Compaaração do espaço conformacional dinâmico de quitinases do mesmo gênero e gêneros diferentes. (A) Sobreposição espacial entre quitinases de Cryptococcus. (B) Segregação espacial entre quitinases de gêneros distintos (Cryptococcus e Kwoniella).

CÓDIGO: SB0540

AUTOR: IZABEL ESTHER GOMES DIAS

ORIENTADOR: MANUELA SALES LIMA NASCIMENTO

TÍTULO: Avaliação da produção de quimiocinas em pacientes portadores das diferentes formas clínicas crônicas da doença de Chagas

Resumo

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, apresenta diferentes manifestações clínicas na fase crônica: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva, sendo a resposta imunológica contra a infecção participante do controle do parasitismo e relacionada à formação das lesões crônicas. Nesse contexto, as quimiocinas e seus receptores exercem importante função no recrutamento e na migração de leucócitos para os tecidos inflamados. Por isso, o presente estudo avaliou o padrão de expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Foram analisadas células mononucleares do sangue periférico de 65 indivíduos chagásicos crônicos, distribuídos nas formas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15), além de 15 indivíduos saudáveis. A expressão relativa de quimiocinas e receptores foi determinada por PCR em tempo real. Pacientes com a forma cardíaca apresentaram maior expressão de CXCL9, CXCL10, CXCR3 e CCR5. Na forma digestiva, observou-se maior expressão de CCR3, além de correlação positiva entre esse receptor e a dimensão do sigmoide. A expressão de CCL5 foi elevada na forma cardiodigestiva. Os resultados indicaram que diferentes padrões de expressão de quimiocinas e receptores estão associados às manifestações clínicas da doença de Chagas, sugerindo participação dessas moléculas na diferenciação dos perfis imunológicos e na patogênese das formas clínicas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Trypanosoma cruzi; Quimiocinas; Imunidade.

TITLE: Evaluation of chemokine production in patients with different chronic clinical forms of Chagas disease

Abstract

Chagas disease, caused by the protozoan Trypanosoma cruzi, presents different clinical manifestations during the chronic phase, including indeterminate, cardiac, digestive and

cardiodigestive forms. The immune response contributes to parasite control, but is also involved in the development of chronic lesions. Chemokines and their receptors play an important role in leukocyte recruitment and migration to inflamed tissues. This study evaluated the expression profile of chemokines and chemokine receptors in patients with different clinical forms of Chagas disease. Peripheral blood mononuclear cells from 65 chronically infected individuals were analyzed, including indeterminate (n=18), cardiac (n=17), digestive (n=15) and cardiodigestive (n=15) forms, as well as 15 healthy individuals. Relative gene expression was determined by real-time PCR. Patients with the cardiac form showed increased expression of CXCL9, CXCL10, CXCR3 and CCR5. The digestive form showed increased CCR3 expression and a positive correlation between this receptor and sigmoid dimension. CCL5 expression was increased in the cardiodigestive form. These findings indicate that distinct chemokine and chemokine receptor expression patterns are associated with the clinical manifestations of Chagas disease, suggesting their participation in immune profile differentiation and disease pathogenesis.

Keywords: Chagas disease; Trypanosoma cruzi; Chemokines; Receptors; Immunity.

Introdução

A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), descrita por Carlos Chagas no início do século XX. Atualmente, estima-se que existam cerca de 8 milhões de pessoas infectadas pelo parasito no mundo, principalmente em países endêmicos da América Latina (WHO, 2026), sendo o Brasil um país em que a doença de Chagas permanece como um importante problema de saúde pública (WHO, 2015). No Rio Grande do Norte, os casos estão concentrados principalmente em municípios da mesorregião Oeste, onde estudos sorológicos demonstraram relevante prevalência da infecção pelo *T. cruzi* (BRITO et al., 2012).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado cuja transmissão ocorre principalmente por meio de triatomíneos, embora também possa ocorrer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, via congênita, via oral e acidentes laboratoriais (BRENER, 1973). Após a fase aguda, os indivíduos infectados evoluem para a fase crônica, que pode permanecer assintomática ou desenvolver diferentes manifestações clínicas, classificadas como formas indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (RASSI et al.,2010).

A forma indeterminada caracteriza-se pela presença de infecção sem manifestações clínicas ou alterações nos exames cardíacos e radiológicos. A forma cardíaca, presente em aproximadamente 20 a 30% dos indivíduos infectados, caracteriza-se pelo comprometimento do miocárdio e pode evoluir para cardiomegalia, insuficiência cardíaca, arritmias e eventos tromboembólicos. Já a forma digestiva está associada principalmente ao megaesôfago e megacólon, decorrentes da destruição de neurônios do sistema nervoso autônomo parassimpático. A forma cardiodigestiva corresponde à associação dos comprometimentos cardíaco e digestivo (FRADE et al., 2025).

A resposta imunológica é fundamental para o controle da infecção pelo T. cruzi, mas também participa da formação das lesões inflamatórias e fibróticas observadas na fase crônica mediante a ativação de importantes eixos de sinalização (MACHADO et al., 2012). A exemplo do eixo IL-12/IFN-γ/iNOS, embora sua ativação exerça importante função no controle da replicação parasitária, a ausência de mecanismos regulatórios pode contribuir para o agravamento da inflamação cardíaca (KAYAMA; TAKEDA, 2010; BASSO, 2013; FRADE et al., 2013). Além disso, diferentes perfis de linfócitos T CD4+, incluindo Th1, Th2, Th17 e Treg, estão relacionados ao desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas (ABEL et al., 2001; GOMES et al., 2003; GUEDES et al., 2012).

As quimiocinas são moléculas de baixo peso molecular responsáveis principalmente pela quimiotaxia e pelo recrutamento de leucócitos. Estas podem ser classificadas nas subfamílias CC, CXC, CX3C e C e atuam por meio de receptores pertencentes às famílias CCR, CXCR, CX3CR e XCR (BLANCHET et al., 2012). A interação entre quimiocinas e seus receptores promove alterações celulares que possibilitam adesão, migração e acúmulo de leucócitos nos locais de infecção e inflamação (CHARO; RANSOHOFF, 2006). Na doença de Chagas, essas moléculas participam tanto da resistência à infecção quanto da patogênese. As quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 podem aumentar a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados, contribuindo para a atividade tripanocida (TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). Já CXCL9, CXCL10 e seus receptores, especialmente CXCR3, estão relacionados ao recrutamento de células do perfil Th1, enquanto CCR3 está associado principalmente ao perfil Th2 (GOMES et al., 2005; GUEDES et al., 2010b).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o padrão de expressão de quimiocinas e seus receptores em pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, buscando relacionar essas moléculas às manifestações clínicas e identificar possíveis marcadores de patogenicidade.

Metodologia

3.1 População do estudo

Foram avaliados 65 indivíduos com doença de Chagas crônica, com idade entre 18 e 69 anos, residentes em dez municípios da mesorregião Oeste do Rio Grande do Norte: Alexandria, Apodi, Caraúbas, Governador Dix-Sept Rosado, Ipanguaçu, Mossoró, Pendências, Rodolfo Fernandes, Serra do Mel e Severiano Melo. A população foi distribuída em quatro grupos clínicos: forma indeterminada (n=18), forma cardíaca (n=17), forma digestiva (n=15) e forma cardiodigestiva (n=15). Também foram incluídos 15 indivíduos saudáveis da mesma região como controles não infectados.

A confirmação da infecção foi realizada por sorologia, utilizando hemaglutinação indireta e imunoensaio enzimático. Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e a exames complementares, incluindo eletrocardiograma, ecocardiograma, radiografia de tórax e exames contrastados do esôfago e do cólon. A classificação nas diferentes formas clínicas foi realizada de acordo com os critérios do II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, sob protocolo nº 027.2011, e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

Foram coletados 15 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque/Histopaque 1.077. Após centrifugação, o anel contendo as células mononucleares foi recuperado, submetido à nova centrifugação e ressuspendido em 500 µL

de Trizol, sendo posteriormente armazenado a -20 °C.

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o SV RNA Isolation System. Após a adição de clorofórmio nas amostras em Trizol, foram realizadas etapas de homogeneização, incubação, centrifugação e separação da fase aquosa. O RNA foi purificado em coluna, submetido ao tratamento com DNase e eluído em água livre de RNase. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, em termociclador convencional. As condições de reação incluíram incubação a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 minutos e manutenção a 4 °C.

3.4 PCR em tempo real

A expressão dos genes foi determinada por PCR quantitativa em tempo real utilizando SYBR Green Master Mix e o termociclador 7500 Fast Real-Time. Foram avaliadas as quimiocinas CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL22, CCL24, CCL27, CCL28, CXCL9 e CXCL10, além dos receptores CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR10 e CXCR3. Os primers foram desenhados com auxílio do software Primer Express ou obtidos da literatura.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços, contendo primers forward e reverse, SYBR Green, água livre de RNase e cDNA. As condições de amplificação foram padronizadas para cada par de iniciadores, considerando concentração, temperatura de anelamento, eficiência de amplificação e formação de dímeros, avaliada pela curva de dissociação. A expressão relativa foi normalizada pela β-actina e calculada pelo método 2^-ΔΔCT.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. Como os dados apresentaram distribuição não paramétrica, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn para comparação entre os grupos. A correlação entre expressão gênica e parâmetros clínicos foi avaliada pelo teste de Spearman. Foram consideradas estatisticamente significativas diferenças com $p<0,05$.

Resultados e Discussões

A análise da expressão gênica demonstrou diferenças entre as formas clínicas da doença de Chagas para algumas das moléculas avaliadas. Pacientes com a forma cardíaca apresentaram maior expressão relativa de RNAm das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e dos receptores CXCR3 e CCR5, quando comparados aos pacientes com a forma indeterminada. Para CXCL10, também houve diferença significativa em relação à forma digestiva (Figura 1). Esse resultado está de acordo com a associação entre cardiomiopatia chagásica e uma resposta Th1 intensa contra o T. cruzi demonstrada na literatura (GOMES et al., 2005). A resposta Th1 promove produção de IFN-γ, importante para a eliminação do parasito e para o controle do parasitismo, mas sua exacerbação também pode intensificar a inflamação cardíaca e contribuir para a gravidade da doença (GOMES et al., 2003). O IFN-γ estimula a expressão de CXCL9 e CXCL10, encontradas no infiltrado inflamatório cardíaco, enquanto CXCR3 é preferencialmente expresso por células T CD4+ Th1, células T CD8+ efetoras e células NK, participando do recrutamento dessas células para os locais inflamados (CRIPPS et al., 2012).

O receptor CCR5 também constitui importante componente do perfil Th1 e participa do recrutamento leucocitário e da inflamação tecidual. Na doença de Chagas, sua expressão está relacionada à formação do infiltrado inflamatório e à patogênese da forma cardíaca (DE OLIVEIRA et al., 2016). Embora CCR5 tenha apresentado maior expressão na forma cardíaca, seus ligantes CCL3, CCL4 e CCL5 não apresentaram aumento significativo nesse grupo. Alguns trabalhos apontam que essa seletividade pode estar relacionada à capacidade do IFN-γ de inibir a produção de outras quimiocinas, favorecendo a expressão de CXCL9 e CXCL10 (BAGGIOLINI, 1998). A importância de CCR5 na doença também é sustentada por estudos genéticos, uma vez que polimorfismos nesse receptor estão associados ao desenvolvimento e à gravidade da cardiomiopatia chagásica, por modificarem sua expressão e, consequentemente, a intensidade do recrutamento de células do perfil Th1 (DE OLIVEIRA et al., 2016). Polimorfismos nos genes CXCL9 e CXCL10 também podem modificar a expressão dessas quimiocinas no miocárdio e influenciar a intensidade da miocardite (NOGUEIRA et al., 2012).

Outro achado importante foi a maior expressão relativa de RNAm do receptor CCR3 nos pacientes com a forma digestiva, quando comparados aos indivíduos das formas indeterminada e cardíaca (Figura 2A). A expressão desse receptor também apresentou correlação positiva com a dimensão do sigmoide nos pacientes com acometimento digestivo e cardiodigestivo (Figura 3). O CCR3 é predominantemente associado ao perfil de resposta Th2 (SEBASTIANI et al., 2001; GUEDES et al., 2010b). A resposta Th2 tem sido relacionada à susceptibilidade à infecção, podendo estar associada a maior parasitismo e inflamação tecidual (KUMAR; TARLETON, 2001). Dessa forma, a maior expressão de CCR3 na forma digestiva pode indicar participação desse perfil imunológico na fisiopatologia do acometimento gastrointestinal. A presença do DNA do T. cruzi no esôfago de pacientes com a forma digestiva também sustenta a possibilidade de persistência parasitária nesses tecidos (VAGO, 1996; LAGES-SILVA et al., 2001). Essa forma está relacionada à inflamação das camadas musculares e à destruição de neurônios autonômos parassimpáticos, alterações que contribuem para o desenvolvimento das mega síndromes (DA SILVEIRA et al., 2005; DA SILVEIRA et al., 2009). Assim, a correlação

observada entre a expressão de CCR3 e a dimensão do sigmoide sugere associação entre o padrão de expressão desse receptor e a extensão do comprometimento intestinal.

Nos pacientes com a forma cardiodigestiva, foi observada maior expressão relativa de RNAm da quimiocina CCL5 quando comparados aos pacientes das formas indeterminada e cardíaca (Figura 2B). A CCL5 possui como principal receptor o CCR5, característico da resposta Th1, mas também pode interagir com CCR3, associado à resposta Th2 (BAGGIOLINI, 1998). Assim, o aumento de CCL5 na forma cardiodigestiva pode favorecer a migração de células pertencentes aos dois perfis de resposta, sem necessariamente estabelecer predominância de Th1 ou Th2.

As demais moléculas avaliadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Não foram observadas alterações significativas na expressão das quimiocinas CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, CCL22, CCL24, CCL27 e CCL28, nem nos receptores CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR8 e CCR10. Esse resultado demonstra que as alterações observadas não correspondem a uma elevação generalizada da expressão de quimiocinas e receptores, mas a padrões específicos relacionados às diferentes manifestações clínicas.

A expressão diferencial dessas moléculas pode ainda sofrer influência da variabilidade genética do parasito. As cepas de T. cruzi são agrupadas em seis unidades discretas de tipagem (DTUs), e no Rio Grande do Norte foram identificados os grupos TcI, TcII e TcIII. Diferenças na expressão de quimiocinas e receptores foram observadas em modelos experimentais infectados com diferentes cepas, sugerindo que a variabilidade do parasito pode influenciar a resposta imune do hospedeiro e, consequentemente, o desenvolvimento das formas clínicas (COSTA et al., 2014; GUEDES et al., 2010b).

Em conjunto, os resultados demonstram que a expressão de quimiocinas e receptores está associada aos diferentes perfis clínicos da doença de Chagas. A predominância de CXCL9, CXCL10, CXCR3 e CCR5 na forma cardíaca sugere maior participação de mecanismos relacionados à resposta Th1, enquanto a maior expressão de CCR3 na forma digestiva aponta para participação de mecanismos associados ao perfil Th2. Já a elevação de CCL5 na forma cardiodigestiva pode refletir a interação entre mecanismos relacionados às respostas Th1 e Th2. A expressão diferencial dessas moléculas pode contribuir para a compreensão da formação e manutenção das lesões e para a identificação de possíveis marcadores imunológicos de progressão da doença (LANNES-VIEIRA et al., 2009). Além disso, compreender os mecanismos que controlam a expressão e a função das quimiocinas pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Mecanismos pós-transcricionais, incluindo a atuação de microRNAs, podem modular a expressão de mediadores inflamatórios, enquanto modificações pós-traducionais também podem alterar a atividade funcional das quimiocinas (MASI et al., 2016). Portanto, o estudo da regulação dessas moléculas pode representar uma abordagem relevante para futuras pesquisas destinadas à modulação da resposta inflamatória sem comprometer o controle do parasito.

Conclusão

Pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas apresentaram maior expressão relativa de RNAm de CCR5, CXCR3, CXCL9 e CXCL10, moléculas associadas ao perfil de resposta Th1, sugerindo maior participação desse padrão imunológico na cardiomiopatia chagásica.

Na forma digestiva, observou-se maior expressão relativa de RNAm de CCR3, receptor associado ao perfil Th2, além de correlação positiva entre sua expressão e a dimensão do sigmoide, indicando possível relação entre esse padrão imunológico e a extensão do comprometimento intestinal.

A forma cardiodigestiva apresentou maior expressão de CCL5, molécula capaz de interagir com receptores associados tanto às respostas Th1 quanto Th2, sugerindo participação conjunta desses perfis na manifestação clínica.

Em conjunto, os resultados demonstram que diferentes padrões de expressão de quimiocinas e receptores estão associados às formas clínicas da doença de Chagas e podem contribuir para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese. A caracterização dessas moléculas pode auxiliar na identificação de potenciais marcadores de patogenicidade e fornecer subsídios para futuras estratégias terapêuticas voltadas à modulação da resposta inflamatória.

Referências

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Geneva: World Health Organization, 2026. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis). Acesso em: 28 ago. 2026.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiological Record, n. 6, p. 33-44, 2015

BRITO, C. R. N.; SAMPAIO, G. H. F.; CÂMARA, A. C. J.; NUNES, D. F.; AZEVEDO, P. R. M.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Seroepidemiology of Trypanosoma cruzi infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 3, p. 346–352, 2012. DOI: https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000300013.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. Annual Review of Microbiology, v. 27, p. 347–382, 1973. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Enfermedad de Chagas. The Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

FRADE, Amanda Farage et al. Cardiac and digestive forms of Chagas disease: an update on pathogenesis, genetics, and therapeutic targets. Mediators of Inflammation, v. 2025, n. 1, p. 8862004, 2025.

MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPÍNDOLA, M. S.; et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. Seminars in Immunopathology, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. Microbes and Infection, v. 12, n. 7, p. 511–517, 2010.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. World Journal of Experimental Medicine, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013.

FRADE, A. F.; PISSETTI, C. W.; et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. BMC Infectious Diseases, v. 13, p. 587, 2013. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-587.

ABEL, L. C.; RIZZO, L. V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection. Journal of Autoimmunity, v. 17, n. 1, p. 99–107, 2001. DOI: https://doi.org/10.1006/jaut.2001.0523.

GOMES, J. A. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; ROCHA, M. O. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infection and Immunity, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003.

GUEDES, P. M. M. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012.

BLANCHET, X.; LANGER, M.; WEBER, C.; KOENEN, R. R.; VON HUNDELSHAUSEN, P. Touch of chemokines. Frontiers in Immunology, v. 3, p. 175, 2012. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00175.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. New England Journal of Medicine, v. 354, n. 6, p. 610–621, 2006. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMra052723.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. Trends in Parasitology, v. 18, n. 6, p. 262–265, 2002. DOI: https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02283-3.

GOMES, J. A. S. et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. Infection and Immunity, v. 73, n. 12, p. 7960-7966, 2005.

GUEDES, P. M. M.; VELOSO, V. M.; TALVANI, A.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; SANTIAGO-SILVA, J.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; SILVA, J. S.; BAHIA, M. T. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in Beagle dogs. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 138, n. 1–2, p. 106–113, 2010. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.06.010.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infection and Immunity, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

CRIPPS, J. G.; et al. Liver inflammation in a mouse model of Th1 hepatitis despite the absence of invariant NKT cells or the Th1 chemokine receptors CXCR3 and CCR5. Laboratory Investigation, v. 92, n. 10, p. 1461–1471, 2012.

DE OLIVEIRA, A. P.; AYO, C. M.; BESTETTI, R. B.; BRANDÃO DE MATTOS, C. C.; CAVASINI, C. E.; DE MATTOS, L. C. The role of CCR5 in Chagas disease: a systematic review. Infection, Genetics and Evolution, v. 45, p. 132–137, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.012.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. Nature, v. 392, p. 565–568, 1998.

DE OLIVEIRA, Amanda P. et al. The role of CCR5 in Chagas disease-a systematic review. Infection, Genetics and Evolution, v. 45, p. 132-137, 2016.

NOGUEIRA, L. G.; et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 10, e1867, 2012.

SEBASTIANI, S. et al. Chemokine Receptor Expression and Function in CD4+ T Lymphocytes with Regulatory Activity. The Journal of Immunology, v. 166, n. 2, p. 996-1002, 2001.

GUEDES, P. M. M. et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 138, p. 106-113, 2010b.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal Trypanosoma cruzi infection in mice. Journal of Immunology, v. 166, n. 7, p. 4596–4603, 2001. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4596.

VAGO, A. R. et al. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet, v. 348, n. 9031, p. 891- 892, 1996.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between Trypanosoma cruzi and Human Chagasic megaesophagus: Blood and tissue parasitism. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 65, p. 435-44, 2001.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. Parasitology, v. 131, p. 627-634, 2005.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. Human immunology, v. 70, n. 1, p. 65-67, 2009.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. Nature, v. 392, p. 565-568, 1998.

COSTA, T. A. et al. Immunomodulation by Trypanosoma cruzi: Toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. Journal of Immunology Research, v. 2014, 2014.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy: From the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 226-235, 2009.

MASI, L. N. et al. Regulation of Gene Expression by Exercise-Related Micrornas. Cellular Physiology and Biochemistry, v. 39, n. 6, p. 2381-2397, 2016.

Anexos



Figura 1



Figura 2



Figura 3

CÓDIGO: SB0545

AUTOR: ANA CAROLINA AQUINO DA LUZ

ORIENTADOR: BENTO JOAO DA GRACA AZEVEDO ABREU

TÍTULO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA MONOHIDRATADA NA MORFOLOGIA DO FÍGADO DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

Resumo

Introdução: A diabetes mellitus (DM) está associada a alterações hepáticas decorrentes de distúrbios metabólicos, inflamatórios e oxidativos. A creatina monohidratada (CM) apresenta potenciais efeitos metabólicos e antioxidantes, porém seus efeitos no fígado diabético permanecem pouco esclarecidos. Objetivo: Avaliar os efeitos da suplementação de CM sobre a morfologia hepática de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Métodos: Foram utilizados 20 ratos Wistar, distribuídos em quatro grupos: controle, controle suplementado, diabético e diabético suplementado. A DM foi induzida por estreptozotocina (40 mg/kg), e a CM foi administrada na ração por sete semanas. Avaliaram-se parâmetros biométricos, alterações histopatológicas hepáticas e imunomarcação para SOD-1. Resultados e discussão: Os animais diabéticos apresentaram maior consumo de água e ração e redução do peso corporal. O grupo diabético apresentou aumento do índice hepatossomático. A suplementação de CM reduziu significativamente hiperemia, esteatose, núcleos picnóticos e fibrose, mas não alterou inflamação, necrose, degeneração hidrópica e balonizante. A imunomarcação de SOD-1 foi reduzida nos grupos diabéticos, sem diferença significativa após suplementação. Conclusão: A CM apresentou efeito parcial sobre alterações morfológicas hepáticas associadas à DM, especialmente esteatose e fibrose, mas não demonstrou efeito significativo sobre alterações inflamatórias ou SOD-1.

Palavras-chave: Diabetes; Creatina monoidratada; Fígado

TITLE: EFFECTS OF CREATINE MONOHYDRATE SUPPLEMENTATION ON LIVER MORPHOLOGY IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus (DM) is associated with hepatic alterations resulting from metabolic, inflammatory, and oxidative disturbances. Creatine monohydrate (CM) has potential metabolic and antioxidant effects; however, its effects on the diabetic liver remain poorly understood. Objective: To evaluate the effects of CM supplementation on the hepatic morphology of streptozotocin-induced diabetic rats. Methods: Twenty

Wistar rats were allocated into four groups: control, supplemented control, diabetic, and supplemented diabetic. DM was induced with streptozotocin (40 mg/kg), and CM was administered in the diet for seven weeks. Biometric parameters, hepatic histopathological alterations, and SOD-1 immunostaining were evaluated. Results and Discussion: Diabetic animals showed increased water and food intake and reduced body weight. The diabetic group exhibited an increased hepatosomatic index. CM supplementation significantly reduced hyperemia, steatosis, pyknotic nuclei, and fibrosis, but did not significantly affect inflammation, necrosis, hydropic degeneration, or ballooning degeneration. SOD-1 immunostaining was reduced in the diabetic groups, with no significant difference following supplementation. Conclusion: CM supplementation had a partial effect on hepatic morphological alterations associated with DM, particularly steatosis and fibrosis, but did not significantly affect inflammatory alterations or SOD-1 immunostaining.

Keywords: Diabetes; Creatine monohydrate; Liver

Introdução

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas crônicas caracterizadas pela hiperglicemia persistente, decorrente da redução da insulina circulante ou de sua ação inadequada nos tecidos-alvo (WHO, 2024). Estima-se que mais de 800 milhões de pessoas convivam com DM no mundo, sendo 112 milhões nas Américas, com aumento de quase 400% entre 1990 e 2022 (OPAS, 2024). Em 2021, o DM ocupou a oitava posição entre as causas de morte globais, apresentando aumento de 95% em relação a 2000 (WHO, 2024). O Brasil é o sexto país em número de pessoas com DM, com 15,7 milhões de casos em 2021 (Sun et al., 2022). O DM tipo 2 é a forma mais frequente e está principalmente relacionado à resistência à insulina, enquanto o tipo 1 decorre da destruição imunomediada das células beta pancreáticas, levando à deficiência de insulina (Rodacki et al., 2023). Outras formas incluem o diabetes gestacional e aquelas associadas a doenças metabólicas, autoimunes, infecções, alterações genéticas ou exposição a compostos químicos (Harreiter et al., 2023).

A hiperglicemia crônica e a resistência à insulina desencadeiam processos inflamatórios, estresse oxidativo e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), contribuindo para lesões sistêmicas (Sharofova et al., 2017). No fígado, a disfunção metabólica aumenta a gliconeogênese e favorece o acúmulo de ácidos graxos, promovendo lipotoxicidade, inflamação e resistência à insulina (Ojo et al., 2023). O excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente de origem mitocondrial, pode superar a capacidade antioxidante celular, estabelecendo estresse oxidativo e danos teciduais (Darenskaya et al., 2021). No DM, esse processo está associado a complicações macro e microvasculares e ao comprometimento de diferentes órgãos (Tomic et al., 2022).

O fígado desempenha funções essenciais no metabolismo da glicose e dos lipídios, na metabolização de medicamentos e na sinalização endócrina, envolvendo células como hepatócitos, células estreladas e células de Kupffer (Trefts et al., 2017). No DM, alterações metabólicas, acúmulo lipídico e respostas imunológicas contribuem para o

desenvolvimento da doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD), anteriormente denominada doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Tanase et al., 2020; Rinella et al., 2023). Indivíduos com DM apresentam maior prevalência de MASLD, além de maior risco de complicações e mortalidade (Castera et al., 2023).

Diante da crescente prevalência do DM, alternativas complementares às intervenções farmacológicas têm sido investigadas. Entre elas, destaca-se a creatina monohidratada (CM), composto nitrogenado que participa da ressíntese de ATP, especialmente em situações de elevada demanda energética (Forbes et al., 2022). Embora seja amplamente conhecida por seus efeitos sobre o desempenho muscular, a creatina também apresenta potenciais efeitos metabólicos e antioxidantes, além de possíveis benefícios sobre o controle glicêmico e a gordura hepática (Kreider et al., 2021). Estudos in vivo indicam ainda redução da inflamação e da fibrose hepática após sua suplementação (Aljobaily et al., 2020). Entretanto, seus efeitos sobre o tecido hepático no contexto do diabetes permanecem pouco esclarecidos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de CM, durante sete semanas, sobre o tecido hepático de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, além de verificar possíveis alterações no fígado de animais saudáveis.

Metodologia

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, com 200–250 g, provenientes do Biotério do Centro de Biociências da UFRN. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com até quatro por caixa, sob temperatura de 24 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração ad libitum. O consumo foi verificado diariamente e o peso corporal, semanalmente, em balança de precisão. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (parecer nº 030.025/2017).

Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em quatro grupos (n=5): controle sem suplementação (C), controle suplementado com creatina (CT), diabético sem suplementação (D) e diabético suplementado com creatina (DT). Após jejum de 14 h, os grupos D e DT receberam dose única intraperitoneal de estreptozotocina (40 mg/kg), dissolvida em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 4,5, para indução do DM tipo 1, conforme Chen et al. (2016). Uma semana depois, a glicemia foi mensurada por sangue da veia caudal com glicosímetro portátil (ONETOUCH® ULTRA®); valores ≥250 mg/dL confirmaram o diabetes. A glicemia foi monitorada semanalmente durante o experimento.

A ração isocalórica suplementada foi preparada com creatina monohidratada (Delaware, Porto Alegre-RS) adicionada à ração comercial triturada, homogeneizada com 150 mL de água/kg, moldada e seca por quatro dias. Os grupos CT e DT receberam creatina em duas fases, segundo protocolo adaptado de Deminice et al. (2009), baseado em Hultman et al. (1996) e Vandenberghe et al. (1997): 13% de creatina por cinco dias antes da indução do diabetes, para saturação, e 2% por 35 dias após a indução, para manutenção. C e D receberam ração isocalórica sem creatina.

Parâmetros biométricos e índice hepatossomático

O peso corporal foi aferido separadamente durante o experimento. O percentual de ganho de peso foi calculado por: [(peso final – peso inicial)/peso final] × 100 (Eleazu e Okafor, 2015). O consumo hídrico foi estimado diariamente a partir da oferta de 1000 mL de água por gaiola, subtraindo-se o volume residual e dividindo o consumo pelo número de animais. Para a ração, foram ofertados 150 g por gaiola/dia; o consumo médio por animal foi obtido pela diferença entre a quantidade ofertada e a residual, dividida pelo número de animais. As medidas foram realizadas com balança de precisão. Ao final, o fígado foi coletado e pesado para cálculo do índice hepatossomático (IHS): (peso do fígado/peso corporal) × 100 (Vazzoler, 1981, 1996).

Análise histológica hepática

Fragmentos hepáticos foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 h, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70–100%), diafanizados em três banhos de xilol, impregnados com parafina a 60 °C, incluídos e seccionados em 4 µm. As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E). Fotomicrografias foram obtidas com sistema Future Winjoe 1.6, em microscópio óptico Leipzig SOLSTICE 4X com câmera Leipzig, nas ampliações de 10× e 40×. A análise morfométrica foi realizada no ImageJ-win64. A avaliação histopatológica utilizou escore semiquantitativo de 0 (ausência de dano) a 4 (≥10 áreas afetadas), considerando hiperemia, degeneração balonizante hialina, degeneração hidrópica, inflamação, esteatose, necrose, fibrose e núcleos picnóticos. A análise foi realizada por patologista experiente, de forma cega quanto aos grupos.

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada conforme Gomes et al. (2025), utilizando três animais por grupo e três cortes por animal. Após desparafinização em xilol e reidratação em concentrações decrescentes de álcool, realizou-se recuperação antigênica por calor em tampão citrato 0,3% (pH 9,5), a 95 °C, por 15 min, seguida de resfriamento por 20 min. Os cortes foram lavados em PBS 1× e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3% (dois banhos de 10 min) e ao bloqueio de ligações inespecíficas com SuperBlock Blocking Buffer por 30 min. Os cortes foram incubados overnight a 4 °C com anticorpo primário anti-SOD-1 (1:100) e, posteriormente, com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à HRP (1:400), também overnight a 4 °C. A revelação foi realizada com DAB. Controles negativos foram preparados sem anticorpo primário. Os tecidos foram contra-corados com hematoxilina e analisados em microscópio Nikon E200 LED com câmera Moticam. A intensidade da imunomarcação (IM) foi classificada em 1–4 (ausente a forte) e sua extensão (EM) em 1–5 (<5% a >75%). O escore ajustado foi calculado por (IM × EM)/5 (Prabhakar, 2016).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e analisados no GraphPad Prism 9. Para variáveis de medida única, utilizou-se ANOVA one-way seguida do pós-teste de Tukey. Para variáveis repetidas, aplicou-se Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Adotou-se $p \leq 0,05$ como nível de significância.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Parâmetros biométricos e índice hepatossomático

O consumo de ração foi maior nos grupos diabéticos em comparação aos grupos controle. O grupo CT apresentou um consumo superior ao grupo controle C, mantendo-se próximo dos valores observados nos grupos experimentais; não havendo diferença estatística entre os grupos diabéticos (Figura 1). De forma semelhante, o consumo de água foi mais elevado nos grupos diabéticos em comparação aos grupos controle. Neste caso, observou-se diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimentais (Figura 1).

Os animais dos grupos experimentais apresentaram uma redução do peso corporal em relação aos grupos controle estatisticamente significativa. Já a diferença de peso do fígado entre os grupos não mostrou diferença significativa (Tabela 1).

Quanto ao índice hepatossomático (IHS), é possível observar que os grupos D e DT apresentaram um valor significativamente maior em comparação aos grupos controle. Já entre os grupos D e DT não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes. (Figura 2).

Análise histopatológica

Neste estudo, nove parâmetros foram avaliados para determinar a integridade do parênquima hepático. O grupo D apresentou um aumento significativo de hiperemia em comparação ao grupo controle (Figura 3), enquanto o grupo DT mostrou uma redução significativa em relação ao grupo D, mantendo-se no nível dos grupos controle (Figura 4).

Também foi observada degeneração balonizante nos hepatócitos (Figura 3), sem diferença estatística entre os grupos (Figura 4). De forma semelhante, a degeneração hidrópica foi avaliada (Figura 3), constatando-se uma diminuição desse tipo de alteração nos grupos diabéticos em relação ao grupo controle. Além disso, o grupo CT também apresentou redução quando comparado ao controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos DT e D (Figura 4). A inflamação foi mensurada pela presença de infiltrado mononuclear no parênquima hepático (Figura 3). Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 4). A presença de esteatose (Figura 3) foi

significativamente aumentada no grupo D. No entanto, a suplementação com creatina foi capaz de manter os níveis de esteatose no grupo DT comparáveis aos observados nos grupos controle (Figura 4). Não houve diferença estatística quanto a intensidade de fibrose (Figura 3) entre os grupos avaliados (Figura 4). A presença de núcleo picnótico (Figura 3) está elevado no grupo D. O grupo DT apresentou resultados semelhantes aos dos grupos controle, estando significativamente menor do que o grupo D (Figura 4).

Imunohistoquímica para SOD-1

Avaliando a marcação imunohistoquímica da SOD-1 (Figura 5) referente aos quatro grupos é possível inferir que os grupos D e DT apresentaram uma redução significativa em relação aos grupos controle (Figura 6). Também é possível observar que não há diferença estatística entre os grupos diabéticos.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a indução do diabetes por STZ foi efetiva nos grupos D e DT, evidenciada pelo aumento no consumo de ração e água, além da diminuição do peso corporal, características típicas do quadro diabético. Não houve redução significativa do índice hepatossomático (IHS) com a suplementação de creatina nos grupos tratados. Também não foi observada melhora significativa em alguns parâmetros histopatológicos, embora outros tenham apresentado melhora estatisticamente relevante. Em relação à imunomarcação de SOD-1 no tecido hepático, não foi observada melhora significativa com o uso da suplementação de creatina.

É estabelecido na literatura que a hiperglicemia crônica é um fator de risco para o desenvolvimento de complicações hepáticas em pacientes diabéticos. Leite et al. (2014) demonstraram que há uma relação mútua entre o DM e a MASLD, uma vez que pacientes que apresentam uma dessas condições têm risco aumentado de desenvolver a outra ou de agravar a doença pré-existente.

Apesar da abordagem padrão para reduzir os danos teciduais envolver, principalmente, o controle da glicemia, a busca por terapias alternativas tem como objetivo complementar os tratamentos já consolidados na literatura em relação à sintomatologia do diabetes. Nesse contexto, a Cr tem se mostrado uma potencial terapia complementar. Casciola et al. (2023) demonstraram que, em modelo experimental com ratos, a suplementação de Cr foi capaz de reduzir o acúmulo de gordura no fígado, além de mitigar o estresse oxidativo. Por outro lado, Souza et al. (2009) observaram que a suplementação com altas doses de Cr, administradas por um período prolongado, causou toxicidade e danos hepáticos, indicando que doses acima do recomendado podem produzir efeitos deletérios a longo prazo. Entretanto, a creatina possui uma notória ação antioxidante ao sequestrar espécies reativas de forma direta em ambiente in vitro, descrito por Sestili et al. (2006).

Neste estudo, o peso corporal dos grupos D e DT foi significativamente reduzido em relação aos grupos C e CT. O peso hepático dos grupos D e DT não apresentou diferença estatística em comparação aos grupos controle. Essas alterações são consistentes com o quadro de indivíduos diabéticos, indicando que a suplementação de creatina não foi capaz de prevenir a perda de peso nem o aumento da massa hepática.

O consumo de água e ração também aumentou significativamente nos grupos D e DT, sem diferença significativa entre eles, o que demonstra que a suplementação de creatina não promoveu alterações nesses parâmetros. A polifagia e a polidipsia são observadas em ratos induzidos por STZ na literatura como características típicas do diabetes mellitus, conforme descrito por Al Rashed (2011).

Outro parâmetro observado foi o índice hepatossomático (IHS). A análise dos resultados mostrou que os índices dos grupos D e DT estavam aumentados em comparação aos grupos C e CT, mas sem diferenças significativas entre si. Esse biomarcador está relacionado à atividade hepática e à toxicidade, sendo um indicador do estado funcional do órgão (Fang et al. 2009). Nossos dados não indicam redução do IHS com o uso da creatina.

A partir da análise histopatológica, os animais do grupo DT apresentaram uma redução considerável da hiperemia em relação ao grupo diabético. Evelson e colaboradores (2005) descreveram que os sinusóides, pequenos canais vasculares que transportam o sangue da veia porta ou artéria central, encontravam-se dilatados, o que culmina no aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático. A suplementação de creatina demonstrou capacidade de mitigar essa alteração vascular, promovendo um estado no grupo DT semelhante ao dos grupos controle.

Embora tenha sido observada degeneração balonizante em todos os grupos, não houve diferença significativa entre os animais tratados e os controles, sugerindo que a creatina não atua na regulação do volume celular. Esse tipo de degeneração é característico de dano celular grave, como atestado por Leow WQ et al. (2022), na qual correlacionaram a presença de balonização hepática com a gravidade da lesão celular. Contudo, neste estudo, a indução por STZ não provocou lesões significativas em comparação ao grupo controle.

A degeneração hidrópica também é um achado comum nos hepatócitos em modelos diabéticos, podendo ser identificada de forma proeminente, mesmo na ausência de outras alterações histológicas (Wickramasinghe et al. 2024). O grupo D não apresentou sinais de degeneração hidrópica, possivelmente porque esse achado representa uma forma reversível de lesão celular, frequentemente observada nos estágios iniciais do dano tecidual. No entanto, caso o agente agressor persista, outros mecanismos podem ser ativados, desencadeando processos inflamatórios e morte celular, com consequente ativação de mecanismos de reparo tecidual, como a fibrose (Miller et al. 2017).

Durante a progressão da MASLD, o acúmulo de lesões hepatocelulares e a ativação de citocinas inflamatórias levam ao desenvolvimento de fibrose, que pode evoluir para formas mais graves, como a cirrose (Fu Yu et al. 2024). Com o tempo, a fibrose hepática tende a se intensificar caso não seja devidamente tratada, como demonstrado nos animais do grupo diabético. Os animais dos demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, e a fibrose esteve ausente no grupo DT, o que pode indicar um efeito benéfico da suplementação com creatina. Contudo, estudos mais aprofundados são necessários para compreender os mecanismos de ação da creatina na modulação da fibrose hepática.

Na literatura, também está estabelecida a presença de inflamação no fígado diabético, acompanhando concomitantemente outros achados histopatológicos, como a necrose.

Essa intensa mobilização de células inflamatórias, principalmente linfócitos, resulta de níveis elevados de mediadores inflamatórios, como a citocina IL-6, que estão presentes em cenários hiperglicêmicos (Oguyinka et al. 2017). O tratamento com creatina não reduziu a inflamação no grupo DT, indicando que a creatina não possui efeitos anti-inflamatórios no tecido hepático.

A esteatose está fortemente associada ao distúrbio metabólico presente no diabetes. O acúmulo de gordura ocorre em decorrência de diversos mecanismos, tais como: síntese hepática de triacilglicerídeos, oxidação de ácidos graxos, diminuição da produção de lipoproteínas, entre outras alterações metabólicas. O grupo D apresentou uma elevação significativa da esteatose em relação aos grupos controle, enquanto o grupo DT apresentou esteatose em nível semelhante aos controles, apresentando redução estatisticamente significativa em relação ao grupo D. Esses achados corroboram dados da literatura. Forcheron et al. (2009) demonstraram aumento no conteúdo de triacilglicerol no interior dos hepatócitos e na produção de mRNAs lipogênicos no fígado de ratos diabéticos, confirmando o estabelecimento da esteatose hepática. A redução da esteatose no grupo DT evidencia o potencial da creatina na mitigação dessa alteração no fígado diabético.

A necrose é um marcador relevante de dano hepatocelular, refletindo processos irreversíveis de morte celular induzidos por estresse metabólico. Neste estudo, o grupo DT não apresentou diferença significativa em relação ao grupo diabético, indicando que a suplementação de creatina não exerce um efeito na diminuição da necrose nos hepatócitos. A presença de necrose reflete o grau de toxicidade metabólica oriunda da hiperglicemia, ativando processos inflamatórios que agravam a lesão hepática e favorecem a progressão da doença (Luchessi et al. 2015).

Quanto à presença de núcleo picnótico, todos os grupos experimentais apresentaram valores superiores aos grupos controle. No entanto, o grupo DT não apresentou uma redução significativa na quantidade de núcleos picnóticos em relação ao grupo D, o que indica que a suplementação de creatina não atua na atenuação dos núcleos picnóticos.

A marcação imunohistoquímica para a enzima SOD-1 demonstrou que os animais dos grupos D e DT apresentaram menor marcação em comparação aos grupos controle, sem diferença significativa entre os grupos tratados. Diante desses resultados, a creatina possivelmente não exerce melhora na imunomarcação de SOD-1 no fígado. No entanto, a redução da marcação nos grupos diabéticos é intrigante, uma vez que, segundo a literatura, a SOD-1 pode se encontrar elevada em modelos diabéticos, em resposta à elevação dos níveis de radicais livres decorrentes da desordem metabólica (Raza et al. 2015). Esse aumento da atividade antioxidante é compatível com o aumento do estresse oxidativo causado pelo diabetes. Entretanto, em condições crônicas e prolongadas, os níveis de SOD-1 podem reduzir devido a disfunção metabólica e menor capacidade de síntese de novas proteínas, inibindo sua atividade e, portanto, apresentando uma queda na sua presença no fígado (Lucchesi et al. 2013). A redução da disponibilidade de SOD-1 possivelmente acarreta prejuízo nos hepatócitos, porém novos trabalhos devem ser realizados para esclarecer esses achados.

Apesar dos resultados obtidos, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Este trabalho foi desenvolvido a partir de um projeto já em andamento, o qual se encontrava na fase de preparação das lâminas para análise histopatológica.

Dessa forma, não foi possível analisar variações intraexperimentais dos marcadores de toxicidade hepática, como as dosagens séricas de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no sangue dos animais de cada grupo. Além disso, o uso de apenas um marcador imunohistoquímico fornece uma visão limitada do estado hepático e dos efeitos da suplementação de creatina nesse órgão.

Conclusão

CONCLUSÃO

Neste trabalho, o diabetes causou danos hepáticos nos grupos D e DT, possivelmente associados a alterações degenerativas decorrentes da inflamação e do estresse oxidativo. Não houve melhora dos parâmetros biométricos, nem do índice hepatossomático. Observou-se um possível efeito benéfico da suplementação de creatina em alguns parâmetros histopatológicos, especialmente na fibrose e na esteatose. Contudo, esse efeito não foi observado em relação à inflamação e à marcação imunohistológica para SOD-1. Assim, mais estudos são necessários para investigar melhor os achados deste trabalho e para ampliar o entendimento sobre a suplementação de creatina no fígado diabético.

Referências

REFERÊNCIAS

ADISAKWATTANA, S. Cinnamic acid and its derivatives: mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. Nutrients, v. 9, n. 2, p. 163, 21 fev. 2017.

ALFIERI, C. M. et al. What not to overlook in the management of patients with type 2 diabetes mellitus: the nephrological and hepatological perspectives. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 14, p. 7728, 1 jul. 2024.

ALJOBAILY, N. et al. Creatine alleviates doxorubicin-induced liver damage by inhibiting liver fibrosis, inflammation, oxidative stress, and cellular senescence. Nutrients, v. 13, n. 1, p. 41, 1 jan. 2020.

AL RASHED, A. M. Pattern of presentation in type 1 diabetic patients at the diabetes center of a university hospital. Annals of Saudi Medicine, v. 31, n. 3, p. 243, maio 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, v. 34, n. Suppl. 1, jan. 2011.

CASCIOLA, R. et al. Creatine supplementation to improve sarcopenia in chronic liver disease: facts and perspectives. Nutrients, v. 15, n. 4, p. 863, 1 fev. 2023.

CASTERA, L. et al. High prevalence of NASH and advanced fibrosis in type 2 diabetes: a prospective study of 330 outpatients undergoing liver biopsies for elevated ALT, using a low threshold. Diabetes Care, v. 46, n. 7, p. 1354–1362, 1 jul. 2023.

CHEN, Y. et al. Iridoid glycoside from Cornus officinalis ameliorated diabetes mellitus-induced testicular damage in male rats: involvement of suppression of the AGEs/RAGE/p38 MAPK signaling pathway. Journal of Ethnopharmacology, v. 194, p. 850–860, 24 dez. 2016.

DARENSKAYA, M. A. et al. Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, v. 171, n. 2, p. 179–189, 1 maio 2021.

DEMINICE, R. et al. Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. British Journal of Nutrition, p. 102:110, 2009.

ELEAZU, C. O.; OKAFOR, P. Use of unripe plantain (Musa paradisiaca) in the management of diabetes and hepatic dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in rats. Interventional Medicine & Applied Science, 2015.

EVELSON, P. et al. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats: original article. Annals of Hepatology, v. 4, n. 2, p. 115–120, 1 abr. 2005.

FANG, J. K. H. et al. The use of physiological indices in rabbitfish Siganus oramin for monitoring of coastal pollution. Marine Pollution Bulletin, v. 58, n. 8, p. 1229–1235, 1 ago. 2009.

FORBES, S. C. et al. Effects of creatine supplementation on brain function and health. Nutrients, v. 14, n. 5, 1 mar. 2022.

FORCHERON, F. et al. Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. Obesity, v. 17, n. 7, p. 1381–1389, 1 jul. 2009.

FU, Y. et al. Progress in the study of animal models of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. Nutrients, v. 16, n. 18, p. 3120, 15 set. 2024.

GOMES, J. R. et al. Hyperbaric oxygen therapy prevents epithelial atrophy in distal tubules and TGF-β1 overexpression in diabetic rat kidneys. Journal of Molecular Histology, v. 56, n. 1, 1 fev. 2025.

HARREITER, J.; RODEN, M. Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023). Wiener Klinische Wochenschrift, v. 135, n. Suppl. 1, p. 7–17, 1 jan. 2023.

HOLEČEK, M. et al. Dual effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on amino acid, energy, and protein metabolism in the liver and muscles of rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. Biomolecules, v. 10, n. 11, p. 1–16, 1 nov. 2020.

HOLEČEK, M. et al. Side effects of amino acid supplements. Physiological Research, v. 71, n. 1, p. 29–45, 1 fev. 2022.

HULTMAN, E. et al. Muscle creatine loading in men. Journal of Applied Physiology, 1996.

KREIDER, R. et al. Creatine in health and disease. Nutrients, v. 13, n. 2, p. 1–28, 1 fev. 2021.

LEITE, N. C. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: from physiopathological interplay to diagnosis and treatment. World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 26, p. 8377, 14 jul. 2014.

LEOW, W. Q. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: the pathologist's perspective. Clinical and Molecular Hepatology, v. 29, n. Suppl., p. S302, 1 fev. 2022.

LUCCHESI, A. N. et al. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 28, n. 7, p. 502–508, 2013.

LUCCHESI, A. N. et al. Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. Journal of Diabetes Research, v. 2015, p. 494578, 2015.

MENG, W.; LI, L. ZHX2 inhibits diabetes-induced liver injury and ferroptosis by epigenetic silence of YTHDF2. Nutrition and Diabetes, v. 15, n. 1, 1 dez. 2025.

MILLER, M. A.; ZACHARY, J. F. Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. p. 2–43.e19, 1 jan. 2017.

OGUNYINKA, B. I. et al. Protective effects of Parkia biglobosa protein isolate on streptozotocin-induced hepatic damage and oxidative stress in diabetic male rats. Molecules, v. 22, n. 10, p. 1654, 2 out. 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Casos de diabetes aumentaram quatro vezes nas últimas décadas em todo o mundo; ação urgente é necessária. 14 nov. 2024. Disponível em:https://www.paho.org/pt/noticias/14-11-2024-casos-diabetes-aumentaram-quatro-vezes-nas-ultimas-decadas-em-todo-mundo-acao. Acesso em: 7 jun. 2025.

PRABHAKAR, P. K. Pathophysiology of secondary complications of diabetes mellitus. Pathophysiology, [S.l.], v. 9, p. 32–36, 2016.

RAZA, H. et al. Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Zucker diabetic rat liver and brain. Cellular Physiology and Biochemistry, v. 35, n. 3, p. 1241–1251, 1 fev. 2015.

RINELLA, M. E. et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. Hepatology, v. 78, n. 6, p. 1966–1986, 1 dez. 2023.

RODACKI, M. et al. Classificação do diabetes. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023.

SESTILI, P. et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine, v. 40, n. 5, p. 837–849, 2006.

SOUZA, R. A. et al. Effects of high-dose creatine supplementation on kidney and liver responses in sedentary and exercised rats. Journal of Sports Science & Medicine, v. 8, n. 4, p. 672, dez. 2009.

SUN, H. et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. Diabetes Research and Clinical Practice, v. 183, 1 jan. 2022.

SUN, Z.; LAZAR, M. A. Dissociating fatty liver and diabetes. Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 24, n. 1, p. 4–12, jan. 2013.

TANASE, D. M. et al. The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Journal of Diabetes Research, v. 2020.

TANG, L. et al. Dapagliflozin slows the progression of the renal and liver fibrosis associated with type 2 diabetes. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 313, n. 5, p. E563–E576, 29 nov. 2017.

TOMIC, D. et al. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. Nature Reviews Endocrinology, v. 18, n. 9, p. 525–539, 1 set. 2022.

TORTORA, G. J. Princípios de anatomia e fisiologia. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

TREFTS, E. et al. The liver. Current Biology, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 6 nov. 2017.

VANDENBERGHE, K. et al. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. Journal of Applied Physiology, 1997.

Anexos



Figura 1. Consumo de ração (g) e água (mL). Grupos experimentais: Controle (C), Controle Tratado (CT), Diabético (D) e Diabético Tratado (DT), sendo $p<0,05$.



Tabela 1. Peso corporal e peso hepático em gramas. Valores são expressos como média ± desvio padrão (SD). Grupos experimentais: Controle, Controle Tratado, Diabético e Diabético tratado. Sendo $p<0,05$.



Efeitos da suplementação de creatina monohidratada no tecido hepático mediante mensuração do índice hepatossomático (IHS). $*p<0,05$.



Figura 3. Alterações histopatológicas do parênquima hepático. Corada em HE. As imagens A, F e G estão no aumento de 100x e as imagens B, C, D, E e H estão no aumento de 400x.



Figura 4. Efeitos da suplementação de creatina monohidratada no tecido hepático mediante avaliação dos parâmetros histopatológicos selecionados. $*p<0,001$.



Figura 5. Marcação de imunohistoquímica para a enzima superóxido dismutase (SOD-1). Grupos C (A e B), CT (C e D), D (E e F) e DT (G e H). As imagens A, C, E e G estão em aumento de 100x e as imagens B, D, F e H estão no aumento de 400x



Figura 6. Efeitos da suplementação de creatina monohidratada na média de marcação da SOD-1 no tecido hepático. $*p<0,001$.

CÓDIGO: SB0553

AUTOR: SAMUEL JOSIAS DANTAS DE OLIVEIRA

COAUTOR: MELISSA FARIAS ALVES DA SILVA

ORIENTADOR: ADRIANA FERREIRA UCHOA

TÍTULO: Avaliação da atividade antifúngica de extratos de sementes de leguminosas nordestinas contra Candida spp. e Cryptococcus spp.

Resumo

As infecções fúngicas invasivas são um grave problema de saúde pública devido à crescente resistência aos antifúngicos. Nesse contexto, a busca por novos fármacos em plantas endêmicas do Nordeste brasileiro é promissora. Este estudo avaliou o potencial antifúngico de extratos aquosos de sementes de *Amburana cearensis* (EAC), *Anadenanthera colubrina* (EAA), *Erythrina velutina* (EAM) e *Tephrosia toxicaria* (EAT). Os extratos foram testados contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus* por microdiluição para determinar CIM e IC50. O sinergismo do EAA com Fluconazol (FLC) e Anfotericina B (AnB) contra *Nakaseomyces glabratus* (antiga *Candida glabrata*) foi avaliado pelo método *checkerboard* (analisado conforme modelo de Loewe), e a toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*. Apenas o EAA demonstrou CIM (160 µg/mL) contra *N. glabratus*; os demais mostraram inibição parcial. Na modulação, a combinação EAA+FLC revelou 38 Combinações Capazes de Inibir 100% do crescimento (CCIs), sendo 15 sinérgicas segundo o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). A associação EAA+AnB resultou em 28 CCIs, com 8 sinérgicas pelo ICIF. Testes in vivo comprovaram a ausência de toxicidade do EAA a 10 mg/kg. Conclui-se que o EAA apresenta marcante atividade antifúngica, consolidando seu elevado potencial biotecnológico como adjuvante terapêutico.

Palavras-chave: Bioprospecção. Candidíase. Criptococose. Sinergismo. Bioativos.

TITLE: Evaluation of the antifungal activity of seed extracts from Northeastern Brazilian legumes against Candida spp. and Cryptococcus spp.

Abstract

Invasive fungal infections represent a serious public health problem due to the increasing resistance to available antifungals. In this context, the search for new drugs from plants endemic to the Brazilian Northeast shows great promise. This study

evaluated the antifungal potential of aqueous seed extracts of *Amburana cearensis* (EAC), *Anadenanthera colubrina* (EAA), *Erythrina velutina* (EAM), and *Tephrosia toxicari*a (EAT). The extracts were tested against *Candida* and *Cryptococcus* strains by microdilution to determine MIC and IC50. The synergism of EAA with Fluconazole (FLC) and Amphotericin B (AmB) against *Nakaseomyces glabratus* (formerly *Candida glabrata*) was evaluated using the checkerboard method (analyzed according to the Loewe additivity model), and toxicity was assessed in *Galleria mellonella* larvae. Only EAA demonstrated MIC (160 µg/mL) against *N. glabratus*; the other extracts showed partial inhibition. In the modulation assay, the EAA+FLC combination revealed 38 Combinations Capable of Inhibiting 100% of growth (CCIs), 15 of which were classified as synergistic based on the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). The EAA+AmB combination resulted in 28 CCIs, with 8 demonstrating synergism by FICI. In vivo tests confirmed the absence of EAA toxicity at 10 mg/kg. It is concluded that EAA exhibits marked antifungal activity, consolidating its high biotechnological potential as a therapeutic adjuvant.

Keywords: Bioprospecting. Candidiasis. Cryptococcosis. Synergism. Bioactives.

Introdução

As infecções fúngicas invasivas constituem importante problema de saúde pública e representam causa relevante de morbimortalidade, sobretudo em pacientes imunocomprometidos, como pessoas com HIV, indivíduos submetidos à quimioterapia, transplantes de órgãos ou outros tratamentos imunossupressores, além de serem frequentes em ambientes hospitalares (Kennedy *et al*., 2023; Lionakis; Drummond; Hohl, 2023). Entre os principais agentes etiológicos destacam-se espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Candida*. A criptococose, causada por fungos encapsulados do gênero *Cryptococcus*, acomete principalmente pulmões e sistema nervoso central, ocasionando cerca de 150 mil mortes anuais e letalidade de aproximadamente 60% na meningite criptocócica (Francisco; Jong; Hagen, 2021; Denning, 2024; Rajasingham *et al*., 2022). Já a candidíase invasiva, causada por leveduras do gênero *Candida*, está associada a quase um milhão de mortes anuais, com letalidade em torno de 35% (Cornely *et al*., 2025; Denning, 2024).

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde classificou *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* como fungos patogênicos de prioridade crítica, *Candida parapsilosis* e *Nakaseomyces glabratus* como prioridade alta e *Cryptococcus gattii* como prioridade média, ressaltando a crescente resistência aos antifúngicos e a limitada disponibilidade de agentes terapêuticos em países pobres e emergentes (WHO, 2022). Além disso, mudanças climáticas, urbanização e o uso intensivo de fungicidas agrícolas favorecem a expansão desses patógenos (Bottery *et al*., 2025). Nesse contexto, produtos naturais têm despertado interesse como fonte de novos agentes antimicrobianos, uma vez que plantas sintetizam metabólitos bioativos envolvidos na defesa contra microrganismos fitopatogênicos, insetos e herbívoros, e muitos desses fitoquímicos apresentam atividade antimicrobiana ou potencial modulador de fármacos convencionais (Gwinn, 2018; Suganya *et al*., 2022).

Diante desse panorama, extratos de leguminosas nativas do Nordeste brasileiro apresentam resultados promissores. Nosso grupo demonstrou que extratos de *Amburana*

cearensis exibem atividade antifúngica e sinergismo com fluconazol contra *Candida albicans* (Oliveira *et al*., 2020); extratos de *Anadenanthera colubrina* apresentam atividade antifúngica e efeito antibiofilme (Medeiros *et al*., 2021); extratos das raízes de *Tephrosia toxicaria* demonstram atividade antibacteriana, além de terem sido avaliados contra leveduras e fungos filamentosos pelo nosso grupo (Sá *et al*., 2023); e *Erythrina velutina* possui atividade antibacteriana descrita (Adetunji *et al*., 2024), porém seu potencial antifúngico permanece inexplorado.

Logo, considerando a ameaça que as infecções causadas por *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. apresentam para a saúde pública, as limitações dos antifúngicos atualmente disponíveis para o combate dessas micoses devido ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana e reduzida acessibilidade desses fármacos, e o potencial dos extratos oriundos de leguminosas naturais do Nordeste brasileiro para uso terapêutico, este trabalho se propôs a obter extratos aquosos de sementes de *A. cearensis*, *A. colubrina*, *E. velutina* e *T. toxicaria*, determinar a atividade antifúngica desses extratos através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra múltiplas cepas, avaliar o perfil modulatório dos extratos com Anfotericina B e Fluconazol, além de averiguar a toxicidade dos extratos no modelo animal *Galleria mellonella*.

Metodologia

Obtenção das sementes

As sementes de *Anadenanthera colubrina*, *Amburana cearensis* e *Erythrina velutina* foram obtidas através de doação do banco de sementes da Floresta Nacional (Flona) de Nísia Floresta, Unidade de Conservação (UC) gerida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), localizada no município de Nísia Floresta, estado do Rio Grande do Norte (RN). Já as sementes de *Tephrosia toxicaria* foram cedidas pelo Dr. Francisco José Carvalho Moreira, do Laboratório de Fitossanidade de Sementes, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Sobral, coletadas em conformidade ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen n. A3104E7).

Cepas

As leveduras *Candida albicans* ATCC 90029, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus gattii* (R-265), *Cryptococcus neoformans* (H99) e *Nakaseomyces glabratus* (ATCC 2001) foram obtidas do Banco de Microrganismos do Laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical da UFRN, cedidas pela Dra. Raquel Cordeiro Theodoro. As leveduras de *Cryptococcus gattii* (FC1) e *Cryptococcus neoformans* (HGT1) foram originalmente fornecidas respectivamente por Wieland Meyer à Fundação Osvaldo Cruz, Fiocruz Manguinhos, RJ, Brasil (designada como WM178), e pelo Hospital Giselda Trigueiro, Natal, RN, Brasil.

Extração aquosa

As sementes de *A. cearensis*, *E. velutina* e *T. toxicaria* foram trituradas em moinho elétrico, e após peneiração do granulado, foi obtida uma farinha de granulação fina que foi submetida a extração em água destilada na proporção de 1:5 (m/v). O sistema contendo farinha e água foi armazenado em uma temperatura de 4 °C por 24 horas. A farinha de *A. colubrina*, por sua vez, foi submetida a extração na proporção de 1:10 a 80 ºC com agitação constante por 3,5 h. As suspensões foram centrifugadas a 10000 xg por 30 min a 4 °C, e os sobrenadantes obtidos foram congelados, liofilizados e armazenados em tubos hermeticamente fechados até sua utilização nos bioensaios. Os extratos obtidos de *A. cearensis*, *E. velutina*, *T. toxicaria* e *A. colubrina* foram denominados de EAC, EAM, EAT e EAA, respectivamente.

Preparo do inóculo fúngico

As leveduras foram mantidas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) à temperatura de 8 ºC para armazenamento e reativadas através de dois repiques em meio ASD a 30 ºC por um período de 48 a 72 h para espécies do gênero *Cryptococcus* e 24 a 48 h para espécies do gênero *Candida*. Para o preparo do inóculo, foi obtida uma suspensão das células em solução salina estéril 0,85%, ajustada de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland para avaliação da turvação, equivalente à concentração de 1 a 5 x 10^6 UFC/mL. A solução de estoque foi diluída em 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640 e quando associada aos extratos, diluída a 1:2, resultando na concentração final de 5 x 10^2 a 2,5 x 10^3 células/mL em 200 µL.

Avaliação da atividade antifúngica

Em placas de 96 poços, os extratos foram submetidos a diluições seriadas (256-2 µg/mL) para determinação da CIM, definida como a menor concentração dos extratos capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, e da IC50, definida como a concentração capaz de inibir 50% do crescimento. As placas contendo os inóculos confrontados com os extratos foram incubadas sob 35 ± 2 °C até 48 h para espécies do gênero *Candida* e até 72 h para espécies do gênero *Cryptococcus*, com posterior leitura visual conforme os parâmetros da norma M27 (CLSI, 2017). Foi também preparado um controle de esterilidade do meio de cultivo, no qual o inóculo é substituído por soro fisiológico. Os resultados foram expressos como média ± DP (n=3) e analisados no GraphPad Prism® 9.0 (*two-way* ANOVA com teste de Tukey, $p<0,05$). A relação dose-resposta foi calculada por regressão não linear para determinar a IC50.

Ensaio de modulação da atividade antifúngica

O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi determinado através do método *checkerboard* para investigar o efeito antifúngico de diferentes concentrações do extrato (2,5 a 160 µg/mL) combinadas com Anfotericina B (0,03125 a 16 µg/mL) e Fluconazol (0,125 a 64 µg/mL), de acordo com a metodologia de White *et al*. (1996), com fármacos solubilizados conforme o CLSI (2017). As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. O ICIF foi calculado através da seguinte equação:

ICIF = (CIM Ec / CIM Ei) + (CIM AFc / CIM AFi), onde CIM Ec corresponde à CIM do extrato na combinação, CIM Ei à CIM do extrato isolado, CIM AFc à CIM do antifúngico padrão na combinação e CIM AFi à CIM do antifúngico padrão isolado.

Os critérios de interpretação foram: ICIF ≤ 0,5 (sinergismo); >0,5 e ≤ 1 (aditividade); >1 e <2 (indiferença); e ≥ 2 (antagonismo) (Gan *et al*., 2023).

Os dados foram expressos como média ± DP (n=3) e plotados em tabelas no Google Sheets 2025, utilizando equação programada e formatação condicional. Para confirmação da atividade, os dados foram analisados com o software SynergyFinder+ (06.3.2024-R-3.10.3) utilizando o modelo de sinergia Loewe *additivity* (LOEWE) (Loewe, 1953).

Avaliação de toxicidade in vivo com *Galleria mellonella*

Grupos de 10 larvas de *G. mellonella* no último estádio larval (200 a 300 mg) foram tratadas em triplicata com os extratos por meio de injeção intrahemocélica de 10 µL através da última proleg esquerda. Foram incluídos 2 grupos controle: controle não tratado (sem injeção) e controle de veículo (injeção de PBS), para averiguar interferências devido a trauma mecânico. Após injeção, as larvas foram incubadas a 37 ºC no escuro sem alimento por 5 dias, sendo checadas diariamente para monitorar mortalidade, motilidade, melanização e capacidade de formação de casulo (Loh *et al*., 2013), com o intuito de determinar a LD50 (dose capaz de matar 50% das larvas) dos extratos.

Resultados e Discussões

Dentro da faixa de concentrações testadas na triagem antifúngica, apenas o EAA demonstrou CIM de 160 µg/mL contra *N. glabratus*/*C. glabrata*, além de IC50 de 6,48 µg/mL contra o mesmo fungo, e inibição de 25% a 75% contra *C. neoformans* e *C. gattii*. (Figura 1). Os demais extratos apresentaram inibição parcial e variável contra as cepas testadas (Tabela 1).

O ensaio de modulação checkerboard foi feito apenas com o EAA contra *N. glabratus*, visto que este foi o único extrato com um valor de CIM dentro das concentrações testadas. A combinação do EAA com Fluconazol revelou um perfil sinérgico expressivo. Foram identificadas 38 Combinações Capazes de Inibir 100% do Crescimento (CCI), e dentre estas, 15 combinações foram classificadas como sinérgicas pelo modelo matemático utilizado (ICIF). De forma semelhante, a associação entre o EAA e Anfotericina B também revelou efeitos modulatórios, com 28 CCIs e, dentre elas, 8 combinações sinérgicas. A análise das superfícies de resposta geradas através do modelo de aditividade de Loewe corroborou o forte sinergismo constatado nos cálculos de ICIF. Os mapas de calor 2D elaborados evidenciaram nitidamente as zonas de interação (áreas com escores de sinergismo > 10) ocorrendo em baixas concentrações de ambos os compostos (Figuras 2 e 3).

Os testes preliminares in vivo com larvas de *Galleria mellonella* demonstraram ausência de toxicidade do EAA na dose de 10 mg/kg, caracterizada pela sobrevivência das larvas e ausência de morbidade, avaliada através de parâmetros qualitativos como grau de motilidade, melanização e formação de casulo, os quais encontraram-se dentro da normalidade e sem diferença estatística significativa.

Em trabalhos desenvolvidos dentro do nosso grupo de pesquisa, o potencial bioativo do extrato aquoso de *A. colubrina* já foi explorado, com esse extrato apresentando atividade aedicida promissora (Silva, 2022), propriedade potencialmente atrelada a rica presença de metabólitos secundários na sua composição, como a anadanthoflavona, β-sitosterol e ácido paquímico, dentre outras moléculas, além de proteínas como inibidores de proteases e vicilinas, que apresentam atividade inseticida e antifúngica já descrita na literatura (Uchôa *et al*., 2006; Cândido *et al*., 2011; Saeed *et al*., 2021; Silva, 2022; Santos, 2025). As propriedades antifúngicas de *A. colubrina* já foram demonstradas em extratos de casca de caule, com estes apresentando atividade fungistática e fungicida significativa contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (Delices *et al*., 2022), apesar de não existirem estudos publicados até o atual momento que investiguem essa atividade nos extratos de sementes dessa planta.

Por mais que o extrato tenha apresentado combinações sinérgicas com ambos os fármacos testados, observou-se um número expressivo de combinações com um score de sinergia negativo com Anfotericina B, em contraste com Fluconazol, que apresentou scores maiores na análise com o modelo de Loewe (Figuras 2b e 3b). Visto que Anfotericina B exerce seu efeito fungicida através da ligação a ergosterol e consequente formação de poros na membrana plasmática de fungos, e o EAA conhecidamente apresenta um teor significativo de fitoesteróis na sua composição (Santos, 2025), é possível que essas moléculas possam interferir com a ligação fármaco-alvo devido sua similaridade estrutural com o ergosterol, levando a interações antagônicas em determinadas combinações, somando-se ao fato de que extratos vegetais brutos apresentam uma alta diversidade química, e misturas de metabólitos presentes podem levar a interações biológicas complexas (Souza *et al*., 2024).

Ademais, apesar de processos de extração a calor promoverem uma maior degradação de compostos bioativos termolábeis (Basilio-Cortés *et al.*, 2023), observamos que o EAA demonstrou atividade antifúngica considerável, mesmo sendo o único extrato obtido em altas temperaturas (80 ºC), em contraste com os outros extratos estudados que foram obtidos a frio (4º C). É possível que a extração favoreceu uma maior solubilização de moléculas termorresistentes, que possam ser responsáveis pela atividade biológica do extrato, em detrimento de compostos sensíveis ao calor.

Conclusão

Os resultados obtidos evidenciam que o extrato aquoso das sementes de *Anadenanthera colubrina* (EAA) possui forte ação inibitória contra *Nakaseomyces glabratus*, destacando-se também o sinergismo notável com antifúngicos de uso clínico, como o Fluconazol e a Anfotericina B. Tais achados demonstram o elevado potencial biotecnológico do EAA como um adjuvante terapêutico promissor no manejo de micoses. Contudo, para atestar sua segurança e viabilizar futuros ensaios in vivo, é necessária uma investigação toxicológica mais aprofundada com doses maiores do extrato no modelo animal utilizado. Adicionalmente, perspectivas futuras devem focar no isolamento e na caracterização química das moléculas bioativas responsáveis por essa atividade antifúngica, bem como na elucidação de seus respectivos mecanismos de ação.

Referências

ALEXANDER, B. D.; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Wayne, Pa: Clinical And Laboratory Standards Institute, 2017.

ARRIAGA, A. C. et al. Chemical Compounds and Antibacterial Activity of *Tephrosia Toxicaria* Pers. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 2173–2178, 25 out. 2017.

BASILIO-CORTES, Ulin A et al. Impact of Temperature on the Bioactive Compound Content of Aqueous Extracts of Humulus lupulus L. with Different Alpha and Beta Acid Content: A New Potential Antifungal Alternative. **Microbiology Research**, v. 14, n. 1, p. 205–217, 6 fev. 2023.

BOTTERY, Michael et al. Climate change: shifting boundaries of fungal disease in Europe and beyond. **Thorax**, p. thorax-2024–222168, 8 jun. 2025.

CÂNDIDO, S. E. et al. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal,** v. 25, n. 10, p. 3290–3305, out. 2011.

CORNELY, Oliver A et al. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, fev. 2025.

DELICES, Merline et al. *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan: Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 300, p. 115745, 23 set. 2022.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024.

GAN, C. et al. Synergistic Activity of Thymol with Commercial Antibiotics against Critical and High WHO Priority Pathogenic Bacteria. **Plants**, v. 12, n. 9, p. 1868–1868, 2 maio 2023.

GWINN, K. D. **Chapter 7 - Bioactive Natural Products in Plant Disease Control.** Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444640581000078>. Acesso em: 15 abr. 2024.

KENNEDY, R. et al. RISCO EMERGENTE DAS INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS: REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 8, p. 1111–1125, 11 set. 2023.

LIONAKIS, M. S.; DRUMMOND, R. A.; HOHL, T. M. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. **Nature Reviews Immunology**, 4 jan. 2023.

LOEWE S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. **Arzneimittel-Forschung**, v. 3, n. 6, 1953.

LOH, Jacelyn MS et al. Galleria mellonella larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, jul. 2013.

OLIVEIRA, M. T. A. et al. UPLC–MS–QTOF analysis and antifungal activity of Cumaru (*Amburana cearensis*). **3 Biotech** , v. 10, n. 12, 2020.

RAJASINGHAM, Radha et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, ago. 2022.

SAEED, A.; RAFIQ, Z.; SAEED, Q.; et al. Caracterização funcional de uma potente proteína ligante de quitina antimicrobiana e inseticida de sementes de Iberis umbellata L . **Pak J Bot**. ;53(4): 1515 – 1523, 2021.

SÁ, S. et al. *Tephrosia toxicaria* (Sw.) Pers. extracts: Screening by examining aedicidal action under laboratory and field conditions along with its antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial activities. **PLOS ONE**, v. 18, n. 1, p. e0275835–e0275835, 11 jan. 2023.

SANTOS, Naara Ferraz dos. **Estudo fitoquímico do extrato aquoso de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) com atividade aedicida**. Orientadora: Dra. Adriana Ferreira Uchôa. 2025. 72f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

SILVA, Leidiane Barboza da. **Eficácia e segurança do extrato de sementes de Angico (*Anadenanthera colubrina*) contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, em condições de laboratório e de campo**. Orientador: Adriana Ferreira Uchôa. 2022. 123f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

SOUZA, Luanda B. F. C. et al. Mechanism of action and synergistic effect of Eugenia uniflora extract in Candida spp. **PLOS ONE**, v. 19, n. 8, p. e0303878, 13 ago. 2024.

SUGANYA, T. et al. Tackling multiple-drug-resistant bacteria with conventional and complex phytochemicals. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

TOMI LOIS ADETUNJI et al. Erythrina velutina Willd.: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 319, p. 117273–117273, 1 jan. 2024.

UCHÔA, A. F. et al. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 169–178, fev. 2006.

WHITE, R. L. et al. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, ago. 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>.

Anexos



Figura 1 - Gráfico de dose-resposta do EAA sobre diferentes cepas fúngicas. Fonte: Autoria própria.



Tabela 1 - Concentração Inibitória Mediana (IC50) dos extratos avaliados sobre as leveduras testadas. Fonte: Autoria própria.



Figura 2 - Mapas de calor das atividades combinatórias entre EAA e Fluconazol (FLC) contra N. glabratus. A: Mapas de calor da superfície de resposta; B: Mapas de calor do score de sinergia, análise conduzida sob o modelo de aditividade de Loewe.



Figura 3 - Mapas de calor das atividades combinatórias entre EAA e Anfotericina B (AnB) contra N. glabratus. A: Mapas de calor da superfície de resposta; B: Mapas de calor do score de sinergia, análise conduzida sob o modelo de aditividade de Loewe.

CÓDIGO: SB0571

AUTOR: GUILHERME DA SILVA RODRIGUES

COAUTOR: BEATRIZ KETLYN DA CUNHA BATISTA

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de uma nanoemulsão contendo fração enriquecida de fenólicos do extrato de Jatropha gossypiifolia

Resumo

A crescente resistência antimicrobiana representa um dos principais desafios da saúde pública, comprometendo a eficácia dos tratamentos disponíveis e impulsionando a busca por novas alternativas terapêuticas. Este estudo teve como objetivo desenvolver uma nanoemulsão contendo uma fração etanólica de *Jatropha gossypiifolia* enriquecida em compostos fenólicos e avaliar seu potencial antibacteriano e suas características físico-químicas e reológicas. A fração apresentou CIM de 5 mg/mL para *S. aureus*, 1,25 mg/mL para *B. cereus* e 40 mg/mL para *P. aeruginosa*, enquanto as CBM foram de 5, 1,25 e 40 mg/mL, respectivamente. A nanoemulsão contendo a fração apresentou pH de 5,69 ± 0,11, tamanho médio de gotícula de 270,9 ± 13,2 nm, PDI de 0,359 ± 0,062 e potencial zeta de −3,52 ± 1,99 mV. O teor de compostos fenólicos foi de 87,41 ± 7,77 mg EAG/g de extrato. A formulação apresentou comportamento reológico não newtoniano pseudoplástico, com redução da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento. Os resultados indicam que a fração apresenta atividade antibacteriana e que sua incorporação resultou em uma nanoemulsão com características físico-químicas e reológicas compatíveis com aplicação tópica, evidenciando potencial como sistema de liberação de compostos bioativos

Palavras-chave: Jatropha gossypiifolia; Antimicrobianos; Nanoemulsão

TITLE: In vitro evaluation of the antibacterial activity of a nanoemulsion containing a phenolic-enriched fraction of Jatropha gossypiifolia extract

Abstract

Antimicrobial resistance is one of the major public health challenges, compromising the effectiveness of available treatments and driving the search for new therapeutic alternatives. This study aimed to develop a nanoemulsion containing an ethanolic fraction of *Jatropha gossypiifolia* enriched in phenolic compounds and to evaluate its antibacterial activity and physicochemical and rheological characteristics. The fraction showed MIC values of 5 mg/mL against *S. aureus*, 1.25 mg/mL against *B. cereus*, and 40 mg/mL

against *P. aeruginosa*, while the MBC values were 5, 1.25, and 40 mg/mL, respectively. The nanoemulsion containing the fraction showed a pH of 5.69 ± 0.11, mean droplet size of 270.9 ± 13.2 nm, PDI of 0.359 ± 0.062, and zeta potential of −3.52 ± 1.99 mV. The phenolic compound content was 87.41 ± 7.77 mg GAE/g extract. The formulation exhibited non-Newtonian pseudoplastic rheological behavior, with a decrease in apparent viscosity as the shear rate increased. These results indicate that the fraction exhibits antibacterial activity and that its incorporation resulted in a nanoemulsion with physicochemical and rheological characteristics suitable for topical application, demonstrating potential as a delivery system for bioactive compounds.

Keywords: Jatropha gossypiifolia; Antimicrobials; Nanoemulsion.

Introdução

A resistência antimicrobiana constitui um dos principais desafios da saúde pública mundial, comprometendo a eficácia dos tratamentos disponíveis e contribuindo significativamente para o aumento da morbidade e da mortalidade associadas às doenças infecciosas. Estima-se que, em 2019, aproximadamente 4,95 milhões de mortes estiveram relacionadas a infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, evidenciando a necessidade urgente de estratégias terapêuticas alternativas. Além do impacto clínico, a disseminação desses patógenos impõe elevados custos aos sistemas de saúde, decorrentes do prolongamento das internações, da necessidade de terapias mais complexas e do aumento da ocorrência de complicações infecciosas (Ghosh et al., 2019; Murray et al.,2022). A infecção desencadeia uma resposta inflamatória essencial para a eliminação dos microrganismos invasores e para o restabelecimento da homeostase. Durante esse processo, diferentes células do sistema imunológico promovem a liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela contenção do agente infeccioso. Entretanto, quando essa resposta se torna exacerbada ou persistente, ocorre um desequilíbrio entre mecanismos pró e anti-inflamatórios, favorecendo o estresse oxidativo, o dano tecidual e a progressão do processo inflamatório. Esse quadro está diretamente relacionado ao agravamento das infecções, ao comprometimento da recuperação clínica e ao aumento da mortalidade, especialmente em pacientes hospitalizados (Vincent; Van Der Poll; Marshall, 2022). Entre as complicações associadas aos processos infecciosos destacam-se as feridas crônicas, que representam um importante problema de saúde pública devido à elevada incidência, ao difícil manejo clínico e aos altos custos do tratamento. Essas lesões permanecem por longos períodos em estado inflamatório, apresentando redução da capacidade regenerativa dos tecidos e elevada suscetibilidade à colonização por microrganismos oportunistas. A presença de biofilmes bacterianos e de patógenos resistentes dificulta a ação dos antimicrobianos convencionais, prolongando o tempo de cicatrização e reduzindo a eficácia terapêutica (Sen et al., 2009; Bootun, 2013; Duff et al., 2015; Payne et al., 2008; Rittié, 2016). Dessa forma, torna-se necessária a busca por novas alternativas capazes de atuar simultaneamente no controle da infecção, da inflamação e da regeneração tecidual. Nesse contexto, produtos naturais obtidos de espécies vegetais têm despertado crescente interesse científico devido à diversidade de metabólitos secundários biologicamente ativos. Dentre esses, os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, apresentam reconhecidas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, além de ajudarem para o processo de cicatrização por meio da modulação da resposta inflamatória e da redução do estresse oxidativo (Das et al., 2022; Lobiuc et al., 2023; Shamsudin et

al., 2022). A espécie Jatropha gossypiifolia L. destaca-se entre as plantas medicinais por apresentar amplo potencial farmacológico. Estudos demonstram que seus extratos possuem atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante, sugere-se que essa atividade esteja associada principalmente à presença de compostos fenólicos, incluindo flavonoides (Batista et al., 2024; Félix-Silva et al., 2014; Félix-Silva et al., 2018; Xavier-Santos et al., 2018). Considerando essas propriedades, a obtenção de uma fração etanólica enriquecida em compostos fenólicos representa uma estratégia promissora para potencializar sua atividade farmacológica. Assim, este estudo propõe avaliar a atividade antibacteriana in vitro dessa fração como etapa inicial para sua incorporação em uma formulação, estabelecendo bases para futuras investigações sobre a sua aplicação no tratamento de feridas infectadas, contribuindo para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

Metodologia

Obtenção da fração enriquecida de fenólicos

O fracionamento foi realizado a partir de 1 g de extrato hidroetanólico de *Jatropha gossypiifolia* (Jg), por meio de uma coluna cromatográfica clássica com adsorvente XAD-4, a qual é uma resina de polímero não-iônico composta por cadeias de poliestireno reticuladas com divinilbenzeno (KU; LEE, 2000) que adsorve compostos poliaromáticos com relativo baixa massa molecular. O extrato de Jg foi diluído em água, filtrado e, então, eluído pela coluna empacotada com 300 mL de XAD-4 (esse adsorvente, apesar de sólido, é medido em volume e não em termos de massa) e eluído com água, utilizada como fase móvel, a qual foi composta por um gradiente de água 100% até etanol (EtOH) 100% como fase móvel. A FrEtOH obtida foi seca sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Büchi®) à temperatura não superior a 40 ºC.

Atividade antimicrobiana da fração enriquecida de fenólicos

A atividade antimicrobiana da fração foi avaliada in vitro frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (C-01) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), pelo método de microdiluição em caldo, seguindo a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com modificações. A partir de uma cultura bacteriana de 24h em ágar Mueller-Hinton (MH, Himedia®, Índia), uma suspensão microbiana (108 UFC/mL) em salina estéril a 0,9% foi obtida, comparando com a escala 0,5 de McFarland, seguida da diluição na proporção de 1:100 (106 UFC/mL) em caldo MH . Em uma placa de 96 poços, 50 µL da suspensão bacteriana (5x105 UFC/mL) foi adicionado a 50 µL da solução das amostras, dessa forma, após a mistura dos volumes, a concentração final do inóculo em cada poço foi de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. A microplaca foi incubada a 35 + 2 ºC, sob agitação (200 rpm) por 24h. Em seguida, foi adicionado 20µL de resazurina 0,01 % (m/v). Poços com apenas meio de cultivo e solução salina estéril foram utilizados como controle de esterilidade do meio e poços com salina e meio com microrganismo foi usado como controle de crescimento. A CIM foi estabelecida como a mínima concentração em que não houve redução da resarzurina. Para avaliar a viabilidade bacteriana, foram semeadas, em meio sólido, poços que apresentaram inibição do crescimento microbiano. Resumidamente, alíquotas de 10 µL de cada poço foram subcultivadas em ágar MH, sendo posteriormente incubada a 35 + 2 ºC por 24h. O subcultivo da mistura contendo a

suspensão microbiana em meio de cultivo foi utilizado como controle do crescimento microbiano. Foi considerado bactericida a concentração da amostra que inibiu o crescimento bacteriano no caldo MH e no ágar MH, e bacteriostático, a concentração que inibiu o crescimento apenas no caldo MH (AL-ANI et al., 2015).

Obtenção da nanoemulsão contendo a fração enriquecida de fenólicos

A nanoemulsão foi obtida pela técnica de inversão de fases, conforme descrito por Batista (2024), com algumas modificações. A fase oleosa foi composta por 5% de óleo de soja e 5% da mistura de tensoativos (Tween80®:Span80®, 85:15). Enquanto a fase aquosa foi composta por 1% da fração enriquecida de fenólicos, 10% de Poloxamer 407 (P407), 10% de propilenoglicol e água q.s.p. A fração foi solubilizada em água e propilenoglicol e filtrada em membrana de 0,45 µm. A fase aquosa foi adicionada na fase oleosa, por meio de gotejamento (1 gota/segundo), sob agitação magnética de 1500 rpm. O sistema continuou sob agitação por 30 minutos após o término do gotejamento. Após a agitação, foi adicionado 5% de P407 e agitado por mais 30 minutos, em banho de gelo, para completa solubilização. Uma nanoemulsão branca (sem incorporação da fração) foi preparada e usada como controle.

Caracterização físico-química da nanoemulsão

Análise macroscópica

As formulações foram avaliadas macroscópicamente, quanto a características organolépticas, como cor, aparência e fenômenos de instabilidade.

Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio das gotículas e o índice de polidispersão (PDI) da formulação desenvolvida foi avaliado através da metodologia Dynamic Light Scattering (DLS) usando Malvern Zetasiver Nano ZS (Malvern Ins. Ltd, Reino Unido). As amostras foram diluídas em água ultrapura, na proporção de 1:100 (amostra:água, v/v) e lidas em temperatura ambiente, sob ângulo de detecção de 173° e comprimento de onda de 633 nm. Além disso, o potencial zeta foi determinado utilizando o mesmo equipamento. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão.

Avaliação de pH

O pH foi analisado por meio do pHmetro, modelo Gehaka PG 2000, em temperatura ambiente e triplicata. Para isso, as amostras foram diluídas na proporção 1:10 (amostra:água, p/v).

Quantificação do teor de compostos fenólicos totais

Para confirmação da incorporação da fração na formulação, foi realizada a quantificação do conteúdo fenólico total, baseado em Singleton; Rossi (1965) com modificações. Uma solução da nanoemulsão contendo a FrEtOH foi preparada de modo a atingir uma concentração de 2 mg/mL de fração, então a mistura foi filtrada em filtro PVDF 0,45 µm e uma alíquota de 25 µL foi adicionada a microplaca de 96 poços. Em seguida, foi

adicionado 100 µL de bicarbonato de sódio (7,5%, p/v) e 125 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água a 1:10, v/v). A nanoemulsão branca foi utilizada como branco para a reação. Após incubação à temperatura ambiente e abrigo de luz durante 30 minutos, a absorbância foi medida a 765 nm. Uma curva de calibração do ácido gálico, com faixa de concentração de 0,025 a 1 mg/mL foi realizada. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Resultados e Discussões

A fração etanólica enriquecida em compostos fenólicos (FrEtOH) apresentou atividade antibacteriana variada para as cepas testadas. Para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), a FrEtOH apresentou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) e uma Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 5 mg/mL. Em relação a *Bacillus cereus* (C-01), a atividade foi ainda mais expressiva, com CIM de 1,25 mg/mL. Para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), embora tenham sido necessárias concentrações mais elevadas, a FrEtOH apresentou CIM e CBM de 40 mg/mL. Os resultados obtidos são consistentes com estudos anteriores que demonstram o potencial antibacteriano de diferentes extratos de *J. gossypiifolia*, incluindo atividade frente a *S. aureus*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*. A espécie apresenta diversos compostos fenólicos e flavonoides, e estudos de caracterização química já identificaram esses metabólitos em diferentes extratos da planta. Além disso, flavonoides foram descritos como constituintes majoritários em extratos de *J. gossypiifolia*, estando sua concentração associada às diferenças de atividade biológica entre os extratos. Dessa forma, a maior atividade observada para a FrEtOH pode estar relacionada ao enriquecimento em compostos fenólicos, especialmente flavonoides, que podem contribuir para a atividade antibacteriana observada (Félix-Silva et al., 2014; Viana et al., 2020). A nanoemulsão obtida após o processo de inversão de fases apresentou características organolépticas compatíveis com sistemas nanoemulsionados contendo óleo vegetal em sua composição. A nanoemulsão branca, ausente de FrEtOH, apresentou aspecto visual leitoso, homogêneo e de coloração esbranquiçada (Figura 1). Em contrapartida, a nanoemulsão contendo a fração vegetal apresentou coloração amarronzada, característica atribuída à presença dos compostos da fração vegetal incorporada à formulação (Figura 1). Em ambas as formulações, foi observado odor característico do óleo de soja. A caracterização físico-química demonstrou diferenças entre a nanoemulsão branca e a nanoemulsão contendo a fração etanólica de *J. gossypifolia* enriquecida em compostos fenólicos (Tabela 2). A nanoemulsão branca apresentou pH de 6,00 ± 0,10, enquanto a formulação contendo a fração vegetal apresentou pH de 5,69 ± 0,11. Dessa forma, a incorporação da fração promoveu uma discreta redução do pH, possivelmente relacionada à presença de compostos fenólicos e de outros metabólitos de caráter levemente ácido presentes na fração vegetal. Apesar da diferença observada, ambas as formulações apresentaram valores de pH compatíveis com a aplicação cutânea, uma característica importante para formulações tópicas, uma vez que o pH pode influenciar a tolerabilidade cutânea, a estabilidade da formulação e a interação do produto com a barreira da pele (Iskandar et al., 2024; Özdemir et al., 2023). A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) revelou que a nanoemulsão branca apresentou tamanho médio de gotícula de 150,9 ± 1,84 nm, enquanto a formulação contendo a fração apresentou tamanho médio de 270,9 ± 13,2 nm. Embora ambas tenham apresentado tamanho na escala nanométrica, a incorporação da fração vegetal resultou em aumento do diâmetro médio das gotículas. Esse aumento pode estar relacionado à incorporação dos constituintes da fração vegetal na estrutura da formulação e às possíveis interações

desses compostos com os componentes da interface das gotículas. A composição da fase dispersa, a concentração dos componentes e as interações entre os constituintes podem modificar significativamente o tamanho das gotículas e outras propriedades coloidais das nanoemulsões (Wang et al., 2023; Özdemir et al., 2023). Ainda assim, o tamanho obtido para a formulação contendo a fração permanece na escala nanométrica, característica relevante para sistemas destinados à aplicação tópica. Estudos recentes destacam que o tamanho das gotículas constitui um dos principais parâmetros de caracterização de nanoemulsões, estando relacionado às propriedades físicas, à estabilidade e ao comportamento de sistemas destinados à liberação tópica de ativos (Wang et al., 2023; Iskandar et al., 2024). Em relação ao índice de polidispersão (PDI), a nanoemulsão branca apresentou valor de 0,160 ± 0,003, enquanto a nanoemulsão contendo a fração apresentou 0,359 ± 0,062. O aumento do PDI após a incorporação da fração indica maior heterogeneidade na distribuição do tamanho das gotículas. O PDI é um parâmetro importante na caracterização por DLS, pois fornece informações sobre a distribuição dos tamanhos presentes no sistema e, consequentemente, sobre sua homogeneidade. Embora valores menores sejam geralmente desejáveis, a interpretação do PDI deve considerar a composição e as características específicas de cada sistema nanoestruturado, não sendo adequado estabelecer um único valor universal como limite de aceitabilidade (Wang et al., 2023). Nesse contexto, o valor de 0,359 observado na formulação contendo a fração indica aumento da heterogeneidade em relação à nanoemulsão branca, mas não descaracteriza a formulação como um sistema nanoemulsionado. Dessa maneira, os resultados sugerem que a incorporação da fração vegetal modificou a distribuição das gotículas, sem impedir a formação de uma dispersão predominantemente nanométrica. Quanto ao potencial zeta, a nanoemulsão branca apresentou valor de aproximadamente −3,39 ± 0,4 mV, enquanto a formulação contendo a fração vegetal apresentou potencial zeta de −3,52 ± 1,99 mV. Portanto, a incorporação da fração promoveu uma alteração discreta no potencial superficial das gotículas, tornando-o ligeiramente mais negativo. Os baixos valores absolutos observados para ambas as formulações indicam que a estabilização eletrostática provavelmente não constitui o principal mecanismo responsável pela estabilidade do sistema. Embora valores absolutos de potencial zeta próximos ou superiores a ±30 mV sejam frequentemente associados à maior contribuição da repulsão eletrostática, a interpretação desse parâmetro em nanoemulsões deve considerar também a natureza dos agentes estabilizantes e os demais parâmetros físico-químicos da formulação (Wang et al., 2023). Considerando a presença dos tensoativos Tween® 80, Span® 80 e Poloxamer 407, de caráter não iônico, é possível que a estabilidade da nanoemulsão possa estar relacionada à estabilização estérica, na qual a camada de tensoativos presente na interface das gotículas atua como uma barreira física à aproximação e agregação das fases dispersas. Dessa forma, baixos valores de potencial zeta não necessariamente indicam instabilidade quando mecanismos de estabilização não eletrostáticos estão envolvidos (Wang et al., 2023; Iskandar et al., 2024). Assim, os valores de potencial zeta obtidos devem ser interpretados conjuntamente com o tamanho das gotículas, o PDI e os demais parâmetros, uma vez que a avaliação isolada do potencial superficial não é suficiente para determinar as características físico-químicas de uma nanoemulsão. A quantificação dos compostos fenólicos demonstrou um teor de 87,41 ± 7,77 mg de ácido gálico equivalente (EAG)/g de extrato na nanoemulsão contendo a fração etanólica enriquecida em compostos fenólicos (FrEtOH). Esse resultado evidencia a presença de compostos fenólicos após a incorporação da fração ao sistema nanoemulsionado. Além disso, o teor obtido é superior ao previamente descrito para uma nanoemulsão contendo o extrato hidroetanólico de *Jatropha gossypiifolia*, que apresentou 32,04 ± 14,63 mg EAG/g de extrato, conforme relatado por Batista et al. (2024). Em

relação às propriedades reológicas das nanoemulsões, o maior distanciamento entre G' e G" pode estar associado à maior contribuição do comportamento elástico, indicando uma estrutura mais resistente à deformação (Figura 2 e 3) . Esse comportamento é compatível com o observado em sistemas nanoemulsionados estruturados, nos quais a predominância de G' sobre G" está relacionada à maior contribuição das interações estruturais da matriz para o comportamento viscoelástico (Ascrizzi et al., 2025). A avaliação reológica também demonstrou que ambas as formulações apresentaram redução progressiva da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 4), caracterizando comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico (shear-thinning). Esse perfil é desejável em formulações tópicas, uma vez que a elevada viscosidade em repouso favorece a permanência do produto no local de aplicação, enquanto a redução da viscosidade durante o cisalhamento facilita sua espalhabilidade sobre a pele (HERBIG et al., 2023). A caracterização do nanosistema é fundamental para avaliar sua adequação à aplicação em feridas infectadas, uma vez que propriedades como tamanho, distribuição, morfologia e estabilidade podem influenciar sua interação com o tecido e sua atividade antimicrobiana. Assim, a caracterização permite compreender o comportamento da formulação e fornece subsídios para avaliar seu potencial de aplicação tópica no tratamento de feridas infectadas.

Conclusão

A fração etanólica enriquecida em compostos fenólicos de *Jatropha gossypiifolia* demonstrou relevante atividade antibacteriana, especialmente frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, evidenciando seu potencial como fonte de compostos bioativos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A incorporação dessa fração em uma nanoemulsão foi realizada com sucesso resultando em uma formulação com características físico-químicas compatíveis com aplicações tópicas. A nanoemulsão apresentou tamanho médio de gotícula na escala nanométrica, índice de polidispersão compatível com um sistema nanoemulsionado, mas com aumento da polidispersidade após a incorporação da fração, pH compatível com a pele e comportamento reológico pseudoplástico, características que favorecem a estabilidade da formulação, sua espalhabilidade e permanência no local de aplicação. Embora o potencial zeta tenha apresentado valores reduzidos, a estabilidade do sistema pode ser atribuída ao mecanismo de estabilização estérica promovido pelos tensoativos não iônicos utilizados na formulação. Além disso, a incorporação da fração enriquecida não comprometeu as propriedades reológicas da nanoemulsão, mantendo um perfil de fluxo adequado para formulações de administração tópica. A redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento demonstra que o sistema apresenta comportamento favorável durante a aplicação, facilitando o espalhamento sem comprometer sua consistência em repouso. Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a nanoemulsão contendo a fração etanólica enriquecida em compostos fenólicos de *Jatropha gossypiifolia* reúne características promissoras para atuar como sistema de liberação de compostos bioativos. A partir desses resultados, o próximo passo consiste na avaliação da formulação em modelos de feridas infectadas *in vivo*, permitindo investigar sua eficácia terapêutica e segurança em condições biológicas mais próximas da aplicação clínica.

Referências

AL-ANI et al. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. Phytomedicine, v. 22, n. 2, p. 245-255, 2015.

Ascrizzi, G. I. et al. Ultrasound-assisted nanoemulgel preparation: A one-step approach for enhanced rheo-tribological properties. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 106, 104246, 2025.

BATISTA, Beatriz et al. Nanoemulsion containing Jatropha gossypiifolia leaf extract reduces dermonecrosis induced by Bothrops erythromelas venom and accelerates wound closure. Journal of Ethnopharmacology, v. 330, 10 ago. 2024.

BOOTUN, R. Effects of immunosuppressive therapy on wound healing. International wound journal, v. 10, n. 1, p. 98–104, fev. 2013.

CLSI (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; CLSI document M07, Eleventh. “Clinical and Laboratory Standards Institute,”Wayne, PA.

DAS, Manash C. et al. Vitexin alters Staphylococcus aureus surface hydrophobicity to obstruct biofilm formation. Microbiological Research, v. 263, 1 out. 2022.

DUFF, M. et al. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. Clinical diabetes : a publication of the American Diabetes Association, v. 33, n. 1, p. 40–48, jan. 2015.

FÉLIX-SILVA, Juliana et al. Systemic and local anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract from Jatropha gossypiifolia L. (Euphorbiaceae). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 6, n. 6, p. 142–145, 2014.

FÉLIX-SILVA, Juliana et al. *In vitro* anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. BMC complementary and alternative medicine, v. 14, p. 405, 2014.

FÉLIX-SILVA, Juliana et al. Comparison of two Jatropha species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against Bothrops erythromelas venom and antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, v. 213, n. November 2017, p. 12–20, 2018.

LOBIUC, Andrei et al. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. Molecule, 1 fev. 2023.

GHOSH, C. et al. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. Trends in Microbiology, v. 27, n. 4, p. 323–338, 2019.

HERBIG, M. E.; EVERS, D.-H.; GORISSEN, S.; KÖLLMER, M. Rational Design of Topical Semi-Solid Dosage Forms—How Far Are We? Pharmaceutics, v. 15, n. 7, p. 1822, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15071822.

ISKANDAR, Benni; LIU, Ta-Wei; MEI, Hui-Ching; KUO, I-Chih; SURBOYO, Meircurius Dwi Condro; LIN, Hsiu-Mei; LEE, Ching-Kuo. Herbal nanoemulsions in cosmetic science: a comprehensive review of design, preparation, formulation, and characterization. Journal of Food and Drug Analysis, v. 32, n. 4, p. 428-458, 2024. DOI: 10.38212/2224-6614.3526.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

ÖZDEMIR, Samet; ÜNER, Burcu; KARAKÜÇÜK, Alptuğ; ÇELIK, Burak; SÜMER, Engin; TAŞ, Çetin. Nanoemulsions as a promising carrier for topical delivery of etodolac: formulation development and characterization. Pharmaceutics, v. 15, n. 10, p. 2510, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102510.

PAYNE, W. G. et al. Wound healing in patients with cancer. Eplasty, v. 8, p. e9–e9, 11 jan. 2008.

RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. Journal of cell communication and signaling, v. 10, n. 2, p. 103–120, jun. 2016.

SEN, C. K. et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. Wound repair and regeneration. United States, 2009.

SHAMSUDIN, Nur Farisya et al. Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. Molecules, 1 fev. 2022.

VINCENT, J.-L.; VAN DER POLL, T.; MARSHALL, J. C. The End of “One Size Fits All” Sepsis Therapies: Toward an Individualized Approach. Biomedicines, v. 10, n. 9, set. 2022.

WANG, Xinyue; ANTON, Halina; VANDAMME, Thierry; ANTON, Nicolas. Updated insight into the characterization of nano-emulsions. Expert Opinion on Drug Delivery, v. 20, n. 1, p. 93-114, 2023. DOI: 10.1080/17425247.2023.2154075.

XAVIER-SANTOS, Jacinthia B. et al. Development of an effective and safe topical anti-inflammatory gel containing Jatropha gossypiifolia leaf extract: Results from a pre-clinical trial in mice. Journal of Ethnopharmacology, v. 227, p. 268–278, 5 dez. 2018

Anexos



Figura 1



Tabela 1



Tabela 2



Figura 2



Figura 3



Figura 4

CÓDIGO: SB0577

AUTOR: EMILLY RIBEIRO DE SOUZA OLIVEIRA

COAUTOR: EDUARDA OLIVEIRA DE SOUZA

COAUTOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

COAUTOR: ALICE DE MORAES CALVENTE

COAUTOR: FELIPE ALEXANDRE CORDEIRO FERNANDES

ORIENTADOR: ALEXANDRE FADIGAS DE SOUZA

TÍTULO: Identidade interna das Florestas Tropicais Sazonalmente Secas: uma revisão de literatura - Continuação

Resumo

A Tipologia Global de Ecossistemas da IUCN fornece base para conservação e manejo, mas o termo Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (FTSS) tem sido usado como conceito guarda-chuva, englobando desde arbustais espinhosos e cactáceos até florestas semidecíduas. Essa generalização pode ocultar diferenças funcionais, taxonômicas e ambientais importantes, dificultando práticas de manejo e conservação. Para avaliar a coerência interna do conceito de FTSS, foi conduzida uma revisão sistemática (PRISMA EcoEvo) nas bases Web of Science e Scopus, abrangendo ecossistemas tropicais e subtropicais sazonalmente secos não savânicos. Após triagem de 16.600 registros, 500 artigos foram incluídos na base final e 300 já foram analisados. Os resultados mostram aumento expressivo das pesquisas desde a década de 1990, mas revelam que a maioria dos trabalhos não diferencia claramente os subtipos de FTSS, usando termos amplos ou regionais como caatinga, miombo woodland e “dry forest”. A discussão aponta que muitos autores desconhecem ou simplificam a classificação, não deixando claro, por exemplo, se as florestas que estão sendo estudadas são decíduas latifoliadas ou rigidifoliadas. Conclui-se que, embora haja crescente interesse científico, o uso indiscriminado do termo FTSS oculta especificidades ecológicas. Diferenciar os subtipos é fundamental para gerar conhecimento aplicável à conservação, restauração, manejo e compreensão da biodiversidade.

Palavras-chave: Conservação; Biodiversidade; Florestas Tropicais; Ecossistemas; IUCN.

TITLE: Internal Identity of Seasonally Dry Tropical Forests: a literature review - continuation

Abstract

The IUCN Global Ecosystem Typology provides a basis for conservation and management, but the term Seasonally Dry Tropical Forests (SDTF) has been used as an umbrella concept, encompassing ecosystems ranging from spiny shrublands and cactus formations to semi-deciduous forests. Such generalization may obscure important functional, taxonomic, and environmental differences, hindering management and conservation practices. To assess the internal coherence of the SDTF concept, a systematic review (PRISMA EcoEvo) was conducted in the Web of Science and Scopus databases, covering seasonally dry tropical and subtropical non-savanna ecosystems. After screening 16,600 records, 500 articles comprised the final dataset, of which 300 have already been analyzed. Results show a sharp increase in research since the 1990s but reveal that most studies do not clearly differentiate SDTF subtypes, using broad or regional terms such as caatinga, miombo woodland, and “dry forest.” The discussion highlights that many authors either overlook or oversimplify classification, failing to specify, for example, whether the forests under study are broad-leaved deciduous or sclerophyllous. It is concluded that, although scientific interest is increasing, the indiscriminate use of the SDTF term conceals ecological specificities. Differentiating subtypes is essential to generate knowledge applicable to conservation, restoration, management, and the understanding of biodiversity.

Keywords: Conservation; Biodiversity; Tropical Forests; Ecosystems; IUCN.

Introdução

Uma série complexa de tipos de vegetação incluindo desde florestas tropicais pluviais perenifólias até os desertos (Beard 1944, 1955, Linares-Palomino 2011, Faber-Langendoen et al. 2014, Navarro e Molina 2021) é formada ao longo do gradiente que vai de climas úmidos até os áridos e hiper-áridos (Koutroulis 2018)(Figura 1). Essas diferentes fisionomias sazonais são frequentemente referidas por uma variedade de nomes regionais ou então por termos amplos como tropical dry forest biome (Dexter et al. 2018, Slik et al. 2018), florestas sazonais, florestas secas ou Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (SDTF)(Pennington 2009, Linares-Palomino 2011). Por indicarem um

agrupamento muito amplo de tipos de vegetação, esses termos podem ser considerados termos guarda-chuva (Pennington 2009). Entre estes nomes, o que tem sido usado com base em uma definição mais clara, embora muito ampla, é SDTF, que limita-se às regiões tropicais.

As SDTF são fisionomicamente muito variáveis, e são referidas na literatura de forma muito heterogênea, formando um gradiente de complexidade que vai desde arbustal de cactos (cactus scrub) e matas espinhosas (thorn woodland) até florestas estacionais decíduas e semidecíduas (Beard 1944, 1955, Murphy e Lugo 1986, Mooney 1995, Linares-Palomino 2011, Faber-Langendoen et al. 2014, Navarro e Molina 2021)(Figura 2a). O reconhecimento das SDTF como categoria guarda-chuva para identificar a variedade de fisionomias sujeitas à seca tem promovido o aumento da atenção científica sobre esses ecossistemas e sua maior valorização em esforços de conservação (Portillo-Quintero 2010, Santos et al. 2011, Pulla et al. 2015, Pennington et al. 2018, Ferrer-Paris 2019, Hasnat e Hossain 2020, Noh 2020, Siyum 2020, Ocón 2021).

A Tipologia Global de Ecossistemas da IUCN (IUCN, 2020; Keith et al., 2022; https://global-ecosystems.org/, deste ponto em diante Tipologia) se propõe a criar um sistema de classificação padrão de todos os ecossistemas da Terra, abrangendo todos os reinos (terrestre, marinho, de água doce, subterrâneo) e suas transições, incluindo os ecossistemas antropogênicos. Uma classificação assim pode fornecer uma base para um grande número de aplicações e generalizações ligadas a mudanças ambientais, avaliações de risco e manejo, sendo estratégica para o planejamento da conservação, restauração e do desenvolvimento sustentável específicos para cada tipo de ecossistema (Ferrer-Paris 2019, Noh et al. 2020). A Lista Vermelha de Ecossistemas é uma importante aplicação da tipologia global de ecossistemas, constituindo um padrão para avaliação de risco de colapso de ecossistemas e uma estrutura para monitorar o status dos ecossistemas do mundo (KEITH 2013, 2024). A definição e a descrição claras dos tipos de ecossistemas são, portanto, essenciais para a avaliação da Lista Vermelha de Ecossistemas, para planejamento da restauração, para a avaliação de serviços ecossistêmicos entre outras aplicações teóricas e aplicadas (KEITH 2024).

Apesar de sua importância na valorização dos ecossistemas tropicais sujeitos à seca e da sua consideração como unidade, o uso de termos guarda-chuva como SDTF pode levar os pesquisadores e conservacionistas a negligenciar inadvertidamente a diversidade funcional, taxonômica e evolutiva entre fisionomias muito diferentes agrupadas sob uma mesma denominação genérica. Isso poderia levar a perdas de conhecimento e oportunidades de conservação e manejo (e.g., Torello-Raventos et al. 2013, Faber-Langendoen et al. 2014, Navarro e Molina 2021) estão as florestas latifoliadas semidecíduas e decíduas, matas espinhosas e arbustais com cactos (Beard 1944, 1955) e as florestas semidecíduas mistas de coníferas e angiospermas (Rzedowski 2006, Jin et al. 2021).

Neste trabalho temos como objetivos gerais avaliar a coerência interna do conceito de SDTF, mais especificamente buscamos responder a pergunta: A

produção científica global tem discriminado e estudado os tipos de vegetação existentes dentro das SDTF?

Metodologia

Para responder a nossa pergunta, sobre como a literatura tem nomeado e discriminado ou não os diferentes tipos de SDTF, foi realizada uma revisão sistemática sem data inicial e terminando em dezembro de 2024 para todas as regiões tropicais do planeta. Seguimos o Protocolo PRISMA EcoEvo para garantir transparência e evitar qualquer tendenciosidade (O'Dea et al., 2021). A busca foi realizada nas bases de dados Web of Science e Scopus. Procuramos incluir a maior variedade possível de trabalhos e fisionomias estudados, incluindo na nossa revisão todos os ecossistemas florestais e arbustivos tropicais e subtropicais sazonalmente secos não savânicos, inclusive as woodlands da África e do Cerrado (cerradão) e o Chaco sul-americano.

A busca foi realizada com três técnicas principais: busca manual por meio de termos encadeados com buscadores booleanos, rastreamento para trás e rastreamento para frente. A busca foi realizada em inglês utilizando a expressão: ("seasonally dry tropical forest" OR "sdtf" OR "seasonally dry forest" OR "dry forest" OR "semideciduous forest" OR "deciduous forest" OR "thorn woodland" OR "shrubland" OR "cactus scrub" OR caatinga OR chiquitano OR chaco OR miombo OR mopane) AND (tropical OR subtropical). Os resultados das buscas foram (WoS: 7871 itens retrieved, Scopus: 8623 itens retrieved) exportados e fundidos em uma única planilha. As referências duplicadas foram excluídas utilizando os critérios de ano de publicação, título, autores e DOI, resultando em 9194 registros únicos. Apesar dos termos booleanos estarem em inglês, alguns artigos em espanhol e português foram recuperados na busca e nós os mantivemos na revisão. Um total de 1000 destas referências foram selecionadas aleatoriamente como aptas para serem avaliadas para inclusão ou não na revisão. Estas 1000 referências, na ordem aleatória em que foram selecionadas, foram revisadas sequencialmente até que se completassem 500 artigos incluídos na base de dados final (260 referências não se enquadravam nos critérios de inclusão e as 240 finais não foram revisadas porque alcançamos o critério de 500 artigos revisados).

Com base em uma leitura do título, do abstract, figuras e tabelas, foram incluídos trabalhos escritos em inglês, espanhol ou português sobre qualquer tema que tenha sido conduzido em florestas sazonalmente secas em campo ou através de sensoriamento remoto e excluídos trabalhos focando em processos metabólicos, bioquímicos, genéticos, fisiológicos ou ecofisiológicos feitos exclusivamente em laboratório, assim como aqueles conduzidos em áreas temperadas, áreas urbanas plantadas ou degradadas e trabalhos puramente conceituais, bem como aqueles sobre epidemiologia de doenças tropicais. Foram excluídos também trabalhos com foco em nível de espécie como a descrição de novas espécies, revisão taxonômica (exceto quando considerava explicitamente o habitat de ocorrência dos grupos) e anatomia, assim como trabalhos de palinologia e aqueles baseados puramente em métodos ou filogenia sem relação com algum

tipo de vegetação local. Trabalhos de biogeografia histórica e modelagem de nicho só foram incluídos se o objeto do estudo foi a SDTF ou espécies indicadoras deste grupo de vegetações e não espécies ou grupos taxonômicos isoladamente.

Os 500 trabalhos revisados detalhadamente foram utilizados para extrair dados sobre como os autores nomeiam e classificam as SDTF, assim como os metadados necessários para avaliar a distribuição geográfica deste uso. Para isto, os trabalhos foram classificados entre aqueles que discriminam ou não os quatro tipos específicos de SDTF: florestas semidecíduas, florestas decíduas latifoliadas, thorn woodlands ou arbustais. Apesar de não serem fisionomias florestais, os arbustais foram incluídos porque fazem parte do gradiente estrutural e funcional que existe entre as rainforests e os desertos, e ocorrem frequentemente de forma adjunta ou em mosaico com as florestas secas (e.g., Campos et al. 2020). Quando o tipo de vegetação não foi claramente identificado pelo nome, buscamos na descrição da área de estudo e da coleta dos dados se era possível identificar a fisionomia pela sua descrição. Termos como thorn, spiny e xeric ou xeromorfa, bem como scrub forest foram tomados como indicadores de thorn woodland. Termos como scrub, shrubland ou matorral foram tomados como indicadores de arbustais. florestas descritas como subdecíduas foram consideradas semidecíduas. A classificação do tipo de vegetação correspondeu àquele efetivamente utilizado na coleta de dados e não à descrição geral da vegetação existente na região.

Para a análise dos dados obtidos através da revisão bibliográfica, os trabalhos obtidos foram agrupados, por região biogeográfica, em América tropical e subtropical, afrotropical, sul da ásia (incluindo Myanmar), sul da China e sudeste asiático, Austrália, Oceania e ilhas do Paífico (incluindo a Austrália), e global. Os trabalhos foram categorizados nos oito grandes temas animais, comunidades, ecossistemas, fungos e microrganismos, interações, manejo, paisagem e plantas. Para contabilizar a variedade de termos e expressões utilizadas na literatura para identificar a fisionomia estudada e ao mesmo tempo não inflar artificialmente o número de termos utilizados, consideramos os termos Semi-Deciduous e Semideciduous equivalentes quando utilizados da mesma forma e os agrupamos. Variações de sufixos, como as observadas em Semidecidual e Semideciduous, Xeric e Xerophytic, bem como em Thorn e Thorny, também foram tratadas como sinônimos. A probabilidade de um trabalho discriminar diferentes subtipos de floresta seca foi avaliada através de uma regressão logística (função glm do R, família binomial). Para garantir robustez estatística as categorias com baixa frequência foram agrupadas em um nível “outros” nas variáveis explicativas região biogeográfica, grupo ecológico e métodos (revisão da literatura).

Resultados e Discussões

RESULTADOS

A busca inicial nas duas bases de dados resultou em 16693 itens encontrados. Após a remoção de duplicatas, restaram 9328 trabalhos únicos. O número de trabalhos sobre florestas secas aumentou expressivamente a partir da década de 1990, quando o número de citações alcançou aproximadamente 100 citações por ano, atingindo mais de 600 citações por ano no começo da década de 2020 (Fig. 3a). O nome mais usado na literatura foi “Dry Forest” com suas variações incluindo referências ao regime climático Tropical ou Subtropical e biogeográficas como Neotropical, totalizando 3011 usos (32.8% do total). O primeiro uso do termo "Seasonally Dry Tropical Forest" (incluindo sua variação no plural) entre os trabalhos encontrados foi em 1977 (Walker and Cant 1977). Entre 1977 e 2024, foram identificadas 692 publicações que utilizaram o termo "Seasonally Dry Tropical Forest" nos títulos ou resumos (7.5% do total)(Fig. 3b). Ambos os termos tiveram seu uso crescente ao longo do tempo, principalmente a partir do ano 2000. O uso de Dry Forest cresceu mais do que o uso de Seasonally Dry Tropical Forest. Ao mesmo tempo, houve um aumento consistente na variedade de termos empregados pelos autores ao longo das décadas, tanto no total de trabalhos encontrados (Fig. 3b) como nos 500 trabalhos examinados detalhadamente, entre os quais o pico foi com 26 nomes diferentes em 2024 (Fig. 3c).

Os 500 trabalhos avaliados estavam distribuídos em 248 revistas científicas, com dados coletados em 53 países diferentes. A grande maioria desses trabalhos foi feita nas Américas (71,8%), seguido, em menores proporções, pelas regiões do Sul da Ásia (9,8%), Afrotropical (8,4%), Sudeste Asiatico (4,6%), global (3,2%) e Oceania e Ilhas do Pacífico (2,2%). A maioria dos trabalhos revisados tinha plantas como foco de estudo (46%), seguido por animais (23,8%) e ecossistemas (20,4%), com interações, paisagem, fungos e microrganismos, comunidades e manejo representando menos de 5% do total. Os artigos que usaram sensoriamento remoto corresponderam a 12% do total, enquanto 18 trabalhos (3,6%) eram revisões de literatura.

Os autores dos trabalhos avaliados se referiram a vegetação estudada através de 146 nomes e expressões diferentes, incluindo nomes amplos como Dry Forest Biome, nomes regionais como Miombo Woodland e Caatinga e nomes de fisionomias como deciduous thorn vegetation. Os nomes mais comuns na amostra de 500 trabalhos, desconsiderando variações de sufixo e atribuição climática, foram "Dry Forest" (25.6%), "Seasonally Dry Tropical Forest" (10.2%) e "Deciduous Forest" (5.8%)(Figura 3d). A maioria dos trabalhos não discriminou entre fisionomias sazonalmente secas (61,2%)(Figura 3b). Um total de 14 trabalhos (2,8%) incluiu no seu estudo algum tipo de floresta seca juntamente com um arbustal, porém não discriminou entre tipos florestais. A grande maioria dos trabalhos que identificou subtipos específicos de vegetação seca discriminou apenas um subtipo (81,5%). Entre os trabalhos que discriminaram tipos de vegetação (38.8% do total), 41,5% discriminaram a floresta semidecídua, 36,1% a floresta decídua latifoliada, 23,4% o arbustal e 21,5% a thorn woodland (incluindo os trabalhos que identificaram mais de um subtipo). Ainda entre os trabalhos que identificaram fisionomias diferentes, 14,6% trabalharam em mais de um subtipo, porém não permitiram a separação entre os subtipos floresta decídua latifoliada e thorn woodland. Independentemente da identificação de subtipos de florestas secas, a maioria dos trabalhos pôde ser atribuída a um dos

tipos de vegetação sazonalmente secos presentes na tipologia da IUCN (80,6%), sendo a maioria deles classificada como Tropical/Subtropical dry forests and thickets (T1.2, 70,4%), seguido por Seasonally dry tropical shrublands (T3.1, 4%) ou ambos (6,2%).

DISCUSSÃO

A consolidação de termos guarda-chuva para designar as SDTF como "dry forest" e "seasonally dry tropical forest" tem sido muito importante para chamar atenção da comunidade científica e conservacionista para os ecossistemas que sofrem seca sazonal. Isso fica evidenciado no aumento expressivo do número de trabalhos publicados sobre esses ecossistemas nas últimas décadas, assim como no aumento do uso desses termos gerais inclusive na área de conservação (e.g., Portillo-Quintero 2010, Pennington et al. 2018, Ferrer-Paris 2019, Noh 2020). No que se refere à predominância do uso de "dry forest" sobre todos os outros termos na literatura, uma possível explicação poderia ser o fato de que este nome é mais simples e direto do que SDTF, porque dispensa a palavra seasonally, que é longa e acrescenta uma complexidade ao nome que pode não ser muito informativa, uma vez que a seca a que o nome se refere é necessariamente sazonal.

O uso desses termos, porém, não eliminou a necessidade de fazer referência aos diferentes tipos de SDTF e o uso de uma grande variedade de nomes diferentes para este fim. O uso inconsistente desta terminologia específica sugere que a maioria dos autores desconhece os principais tipos de SDTF ou não sabe utilizá-la com segurança. Mesmo quando algumas características da vegetação são informadas, o tipo de vegetação muitas vezes não é claramente definido. Assim, um grande número dos termos usados na literatura gera uma grande ambiguidade e não permite fazer uma ligação direta com uma fisionomia específica. A associação não é possível quando nomes que indicam o regime foliar da vegetação (e.g., decídua, semidecídua) ou a característica funcional (e.g., thorn, rigidifoliada, xerófila, mista com gimnospermas, com suculentas) não são incluídos. Um exemplo é a apresentação fisionomia estudada como floresta decídua porém a distinção com a thorn woodland fica faltando pela falta de indicação dos seus elementos característicos como abundância de suculentas, muitos espinhos, árvores retorcidas (e.g. Cervera et al. 2007, González-Salvatierra et al. 2021). Embora em alguns casos estas informações sejam apresentadas nos resultados e permitam identificar a floresta como thorn woodland (e.g., Murphy e Lugo 1986), na maioria das vezes o foco do trabalho é outro e esta identificação se torna inviável. Já o termo "thicket", por exemplo, costuma se referir a vegetação decídua com alta densidade de árvores finas, mas o termo pode ser usado para se referir a arbustais (Frappier-Brinton e Lehman 2022). Em outros casos a fisionomia é descrita como arbustal e como floresta aberta (woodland) como termos equivalentes (e.g., Vogel et al. 2023). Esses exemplos reforçam a ideia de que as florestas decíduas latifoliadas e as thorn woodland são os dois subtipos menos claramente diferenciados das SDTF, sendo muitas vezes referidas apenas como florestas decíduas (e.g., Toledo-Aceves e García-Oliva 2008).

Alguns trabalhos apresentaram uma descrição detalhada da vegetação presente na região de estudo, diferenciando entre subtipos claramente, porém ao coletar os dados utilizaram uma classificação simplificada sem diferenciação clara de tipos de vegetação (e.g. Southworth 2004). Como a nossa estimativa do número de nomes diferentes usados para se referir a florestas e arbustais secos foi baseada em uma amostragem do total de artigos encontrados com os termos de busca, ela é necessariamente conservadora. Além disso, nossa decisão de desconsiderar nomes climáticos (e.g. Tropical, Subtropical) e variações de sufixos (e.g., Xeric, Xerophytic) também reduziu a variedade de nomes que na prática povoam a literatura e a prática de campo. Nossa estimativa da proporção de trabalhos que identificam com detalhe a fisionomia estudada é provavelmente aumentada pelo fato de que incluímos a diferenciação dos arbustais. Porém, muitos trabalhos que identificam o arbustal também identificam a presença de florestas secas sem especificar o tipo de vegetação específico. Em geral, a classe mais fácil de diferenciar foi o arbustal, que geralmente é contraposto às florestas secas tropicais, sendo estas indiferenciadas pelos autores (e.g.,Sotelo-Caro et al. 2015, Ghosh et al. 2022).

Existe uma diferença importante entre o arbustal latifoliado nas áreas em que chove mais como o Cerrado, e os thorn shrublands ou cactos scrub de regiões semiáridas e áridas como a Caatinga e o extremo sul de Madagascar (Oliveira-Filho 2015). São fisionomias diferentes entre si, mas que praticamente nunca são identificados de forma individualizada nos trabalhos que revisamos, com exceção dos poucos trabalhos que se dedicaram a classificar comunidades vegetais (e.g. Zeballos et al. 2023 para um exemplo de fora dos 500 trabalhos analisados). Em casos muito pontuais o uso do termo cactus scrub ou spiny scrub permite identificar o arbustal rigidifoliado, mas na maioria das vezes o termo shrubland ou scrub é usado de forma vaga (e.g., Park e Miura 2011), tornando o shrubland um outro termo guarda-chuva juntamente com as SDTF. A UICN também não diferencia entre esses dois tipos de arbustais, chamando ambos de arbustais tropicais sazonalmente secos T3.1 (Keith et al. 2022).

Alguns autores utilizaram sistemas de classificação da vegetação ou de ecossistemas estabelecidos para classificar a vegetação que estudaram. Exemplos foram as zonas de vida de Holdridge (e.g., Griscom et al. 2007), as ecorregiões (e,g, Park e Miura 2011) e esquemas de classificação nacionais (e.g., Ferreira et al. 2016). Poucos destes, porém, permitem a clara individualização de diferentes tipos de SDTF. Um exemplo é o uso do termo floresta decídua mista para indicar a co-ocorrência de espécies decíduas, semidecíduas e perenifólias (e.g, Debata e Swain 2019) ou dry deciduous e dry broadleaf forests (e.g. Saha et al. 2023). Terminologias como esta, entretanto, não permitem diferenciar florestas semidecíduas, decíduas e thorn woodland, já que todas estas contém espécies com diferentes regimes foliares, diferenciando-se pela proporção de espécies com cada fenologia e por outras características estruturais. Exceções a classificação oficial da vegetação brasileira (Brasil 2012 #734) e o sistema de Oliveira-Filho (2009). Ambos permitem diferenciar os quatro tipos de SDTF embora apenas o sistema de Oliveira-Filho diferencie entre arbustais latifoliados e thorn shrubland. Um problema parecido foi o uso pelos autores de nomes regionais para a vegetação como Caatinga, Chiquitano, Miombo, Western Ghats, etc. (e.g. Batista de Souza et al. 2024), quando esses

nomes são usados no lugar de uma descrição clara e universal das características das fisionomias estudadas que permitam a sua identificação sem ambiguidade ou sem consulta à literatura regional específica.

Os nomes "dry forest" e SDTF foram reconhecidos por mais de um autor como um termo guarda-chuva para se referir ao complexo de tipos de fisionomias da vegetação e não a uma vegetação específica. Apesar disso, nossa revisão mostra que o que vem prevalecendo na pesquisa ecológica é a substituição do reconhecimento da variedade de fisionomias pelo uso de termos guarda-chuva como Dry Forest ou SDTF. A consequência disso na prática foi dupla: por um lado, como mencionamos acima, a importância e o interesse no estudo das SDTF aumentaram muito. Por outro lado, muito conhecimento gerado em tipos diferentes de florestas secas têm perdido especificidade por não identificar para que fisionomia aquele conhecimento está sendo gerado. Por não caracterizar adequadamente as formações vegetais, as quais são ligadas a características funcionais específicas, perde-se uma parte da interpretação biológica dos resultados na medida em que estes não podem ser associados claramente a um ecossistema em particular, mas sim fica diluído na classe guarda-chuva dry forest ou SDTF. Resultados de uma grande variedade de estudos, indo desde a composição e estrutura da vegetação em si até o comportamento animal, processos ecossistêmicos e genética frequentemente são diferentes entre tipos de SDTF, mas esta informação chave se perde pela falta de identificação da fisionomia específica onde os dados foram coletados. Exemplos foram a avaliação da qualidade e função do solo em áreas de SDTF no Ecuador (De Sosa et al. 2024), padrões de diversidade de borboletas em Ghana (Bossart et al. 2006), variação nos nutrientes foliares na Tailândia (Hietz et al. 2011) e taxas de desmatamento em diferentes domínios biogeográficos no Brasil (Portillo-Quintero et al. 2013). Todos esses resultados e muitos outros provavelmente contém variações importantes não identificadas entre tipos de florestas secas, porém essa informação não existe porque os diferentes pontos amostrais foram identificados somente com um termo genérico como SDTF ou dry forest.

Conclusão

Nossa revisão sistemática da literatura sugere que muitos dos pesquisadores não associam seus resultados a um tipo específico de SDTF. Essa falta de associação provavelmente representa um desperdício crônico da oportunidade de conhecermos mais profundamente as propriedades dos diferentes tipos de ecossistemas existentes dentro das SDTF. O uso de termos genéricos como dry forest, SDTF e suas variações parece estar muitas vezes substituindo as identidades específicas dos ecossistemas, e muitos pesquisadores parecem não ter consciência que as SDTF são um espectro de ecossistemas diferentes e não um tipo de ecossistema em si mesmas. Além disso, nos casos em que essas diferenças são reconhecidas, uma variedade de termos heterogêneos está sendo utilizada para identificá-los, o que também não contribui para a clareza e a comunicação sobre eles. A ausência de uma nomenclatura unificada para os tipos de vegetação faz com que resultados obtidos em formações designadas

por terminologias regionais ou sistemas de classificação específicos sejam de difícil comparação com equivalentes ecológicos de outras regiões, já que pesquisadores diferentes podem operar com referenciais distintos.

Referências

BATISTA DE SOUSA, José et al. Effects of grazing on functional diversity along secondary succession in a tropical dry forest (Caatinga, Brazil). Applied Vegetation Science, v. 27, n. 2, p. e12783, 2024.

BEARD, John S. Climax vegetation in tropical America. Ecology, v. 25, n. 2, p. 127-158, 1944.

BEARD, John S. The classification of tropical American vegetation-types. Ecology, v. 36, n. 1, p. 89-100, 1955.

BOSSART, J. L. et al. Richness, abundance, and complementarity of fruit-feeding butterfly species in relict sacred forests and forest reserves of Ghana. Biodiversity & Conservation, v. 15, n. 1, p. 333-359, 2006.

CAMPOS, Adolfo; SUÁREZ, Gabriela; LABORDE, Javier. Analyzing vegetation cover-induced organic matter mineralization dynamics in sandy soils from tropical dry coastal ecosystems. Catena, v. 185, p. 104264, 2020.

CERVERA, J. C. et al. Photosynthesis and Optimal Light Microhabitats for a Rare Cactus, Mammillaria gaumeri, in Two Tropical Ecosystems. Biotropica, v. 39, n. 5, p. 620-627, 2007.

DE SOSA, Laura L. et al. Ecosystem function associated with soil organic carbon declines with tropical dry forest degradation. Land Degradation & Development, v. 35, n. 6, p. 2109-2121, 2024.

DEBATA, Subrat; SWAIN, Kedar Kumar. Group size and population structure of vulnerable Gaur in an isolated tropical deciduous forest of eastern India. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, v. 89, n. 1, p. 89-94, 2019.

DEXTER, Kyle G. et al. Inserting tropical dry forests into the discussion on biome transitions in the tropics. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 6, p. 104, 2018.

FABER-LANGENDOEN, Don et al. EcoVeg: a new approach to vegetation description and classification. Ecological Monographs, v. 84, n. 4, p. 533-561, 2014.

FERRER-PARIS, José Rafael et al. An ecosystem risk assessment of temperate and tropical forests of the Americas with an outlook on future conservation strategies. Conservation Letters, v. 12, n. 2, p. e12623, 2019.

FERREIRA, R. L. C. et al. Riqueza e diversidade de áreas de Caatinga em diferentes estágios sucessionais no nordeste do Brasil. 2016.

FRAPPIER-BRINTON, Tristan; LEHMAN, Shawn M. The burning island: Spatiotemporal patterns of fire occurrence in Madagascar. PLoS ONE, v. 17, n. 3, p. e0263313, 2022.

GHOSH, Sujit M. et al. Predicting the forest canopy height from LiDAR and multi-sensor data using machine learning over India. Remote Sensing, v. 14, n. 23, p. 5968, 2022.

GONZÁLEZ-SALVATIERRA, Claudia et al. Seasonal changes in photosynthesis for the epiphytic bromeliad Tillandsia brachycaulos in a tropical dry deciduous forest. Botanical Sciences, v. 99, n. 4, p. 850-862, 2021.

GRISCOM, Heather P.; KALKO, Elisabeth K. V.; ASHTON, Mark S. Frugivory by small vertebrates within a deforested, dry tropical region of Central America. Biotropica, v. 39, n. 2, p. 278-282, 2007.

HASNAT, G. N. Tanjina; HOSSAIN, Mohammed Kamal. Global overview of tropical dry forests. In: Handbook of Research on the Conservation and Restoration of Tropical Dry Forests. [S. l.: s. n.], 2020. p. 1-23.

HIETZ, Peter et al. Long-term change in the nitrogen cycle of tropical forests. Science, v. 334, n. 6056, p. 664-666, 2011.

JIN, Wei-Tao et al. Phylogenomic and ecological analyses reveal the spatiotemporal evolution of global pines. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 118, n. 20, p. e2022302118, 2021.

KEITH, David A. et al. A function-based typology for Earth's ecosystems. Nature, v. 610, n. 7932, p. 513-518, 2022.

KEITH, David A. et al. Scientific foundations for an IUCN Red List of Ecosystems. PLoS ONE, v. 8, n. 5, p. e62111, 2013.

KEITH, David A. et al. Contributions of the IUCN Red List of Ecosystems to risk-based design and management of protected and conserved areas in Africa. Conservation Biology, v. 38, n. 3, p. e14169, 2024.

KOUTROULIS, Aristeidis G. Dryland changes under different levels of global warming. Science of The Total Environment, v. 655, p. 482-511, 2019.

LINARES-PALOMINO, Reynaldo; OLIVEIRA-FILHO, Ary T.; PENNINGTON, R. Toby. Neotropical seasonally dry forests: diversity, endemism, and biogeography

of woody plants. In: Seasonally Dry Tropical Forests: ecology and conservation. Washington, DC: Island Press/Center for Resource Economics, 2011. p. 3-21.

MOONEY, Harold A.; BULLOCK, Stephen H.; MEDINA, Ernesto. Introduction. In: BULLOCK, Stephen H.; MOONEY, Harold A.; MEDINA, Ernesto (ed.). Seasonally Dry Tropical Forests. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. cap. 1, p. 1-8.

MURPHY, Peter G.; LUGO, Ariel E. Ecology of tropical dry forest. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 17, p. 67-88, 1986.

NAVARRO, Gonzalo; MOLINA, José Antonio. A novel biome concept and classification system based on bioclimate and vegetation–a Neotropical assay. Vegetation Classification and Survey, v. 2, p. 159-175, 2021.

NOH, Jin Kyoung et al. Warning about conservation status of forest ecosystems in tropical Andes: National assessment based on IUCN criteria. PLoS ONE, v. 15, n. 8, p. e0237877, 2020.

O'DEA, Rose E. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses in ecology and evolutionary biology: a PRISMA extension. Biological Reviews, v. 96, n. 5, p. 1695-1722, 2021.

OCÓN, Jonathan Pando et al. Global tropical dry forest extent and cover: A comparative study of bioclimatic definitions using two climatic data sets. PLoS ONE, v. 16, n. 5, p. e0252063, 2021.

OLIVEIRA-FILHO, Ary T. Um sistema de classificação fisionômico-ecológica da vegetação Neotropical. In: EISENLOHR, P. V. et al. (ed.). Um sistema de classificação fisionômico-ecológica da vegetação Neotropical. Viçosa: Editora UFV, 2015. v. 2, p. 452-473.

PARK, Sunyurp; MIURA, Tomoaki. Moderate-resolution imaging spectroradiometer-based vegetation indices and their fidelity in the tropics. Journal of Applied Remote Sensing, v. 5, n. 1, p. 053555, 2011.

PENNINGTON, R. Toby; LAVIN, Matt; OLIVEIRA-FILHO, Ary T. Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 40, n. 1, p. 437-457, 2009.

PENNINGTON, R. Toby; LEHMANN, Caroline E. R.; ROWLAND, Lucy M. Tropical savannas and dry forests. Current Biology, v. 28, n. 9, p. R541-R545, 2018.

PORTILLO-QUINTERO, Carlos A.; SÁNCHEZ-AZOFEIFA, G. Arturo. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. Biological Conservation, v. 143, n. 1, p. 144-155, 2010.

PORTILLO-QUINTERO, Carlos A.; SÁNCHEZ-AZOFEIFA, G. Arturo; ESPÍRITO-SANTO, Mário Marcos do. Monitoring deforestation with MODIS Active Fires in Neotropical dry forests: An analysis of local-scale assessments in Mexico, Brazil and Bolivia. Journal of Arid Environments, v. 97, p. 150-159, 2013.

PULLA, Sandeep et al. Assessing the resilience of global seasonally dry tropical forests. International Forestry Review, v. 17, n. 2, p. 91-113, 2015.

RZEDOWSKI, Jerzy. Vegetación de México. 1. ed. digital. México: CONABIO, 2006.

SAHA, Soumik et al. Recurrent forest fires, emission of atmospheric pollutants (GHGs) and degradation of tropical dry deciduous forest ecosystem services. Total Environment Research Themes, v. 7, p. 100057, 2023.

SANTOS, Jean Carlos et al. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. Tropical Conservation Science, v. 4, n. 3, p. 276-286, 2011.

SIYUM, Zenebe Girmay. Tropical dry forest dynamics in the context of climate change: syntheses of drivers, gaps, and management perspectives. Ecological Processes, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2020.

SLIK, J. W. Ferry et al. Phylogenetic classification of the world's tropical forests. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 8, p. 1837-1842, 2018.

Anexos



Figura 1) Diversidade das florestas que estão englobadas no termo SDTF.



Figura 2) a) Distribuição global das SDTF e arbustais. b) Distribuição dos trabalhos avaliados na revisão sistemática de literatura.



Figura 3) a) Número de referências bibliográficas sobre florestas secas ao longo do tempo. b) Evolução temporal do consenso terminológico. c) Evolução temporal da diversidade terminológica. d) Nuvem de termos utilizados na literatura.

CÓDIGO: SB0579

AUTOR: VIVIAN GRACIELLY NASCIMENTO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Histopatologia das alterações em ductos salivares durante a indução química da carcinogênese palatina.

Resumo

A carcinogênese oral é um processo complexo e multifatorial, envolvendo diversos mecanismos biológicos e alterações celulares e teciduais que ainda precisam ser melhor compreendidos. O palato é uma localização menos frequente, porém pode apresentar lesões agressivas e importantes comprometimentos funcionais. Dessa forma, a análise clínico-patológica da carcinogênese oral induzida quimicamente é relevante por esclarecer seus mecanismos de desenvolvimento e a origem de alterações que comprometem a cavidade oral e suas funções vitais. Diante disso, foi realizado um estudo utilizando ratos da linhagem Wistar, espécie amplamente utilizados por sua elevada similaridade ao sistema humano, que foram submetidos à indução química da carcinogênese e avaliados quanto a características clínicas, morfométricas nas diferentes etapas de desenvolvimento do carcinoma oral. De modo geral, os resultados indicam que dos 44 animais avaliados, o acúmulo de muco foi a alteração mais frequente (77,3%), seguido pela metaplasia ductal (40,9%), hiperplasia ductal (38,6%) e displasia ductal (29,5%). As alterações ocorreram em diferentes semanas de indução, sem apresentar um padrão progressivo claro ao longo do tempo. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar as características histopatológicas e histomorfométricas dos ductos excretores das glândulas salivares menores palatinas durante a carcinogênese oral induzida quimicamente.

Palavras-chave: Carcinogênese, Câncer Oral, Histopatologia, Histomorfometria.

TITLE: Histopathology of Salivary Duct Alterations During Chemical Induction of Palatal Carcinogenesis

Abstract

Oral carcinogenesis is a complex and multifactorial process involving several biological mechanisms and cellular and tissue alterations that remain to be fully understood. The palate is a less common site of occurrence; however, it may present aggressive lesions and significant functional impairments. Therefore, the clinicopathological analysis of chemically induced oral carcinogenesis is relevant for elucidating its developmental

mechanisms and the origin of alterations that affect the oral cavity and its vital functions. Accordingly, a study was conducted using Wistar rats, a strain widely used due to its high similarity to the human system. The animals underwent chemical induction of carcinogenesis and were evaluated for clinical and morphometric characteristics at different stages of oral carcinoma development. Overall, among the 44 animals evaluated, mucus accumulation was the most frequent alteration (77.3%), followed by ductal metaplasia (40.9%), ductal hyperplasia (38.6%), and ductal dysplasia (29.5%). The alterations occurred at different weeks of induction, without showing a clear progressive pattern over time. In this context, the present study aimed to analyze the histopathological and histomorphometric characteristics of the excretory ducts of the minor palatal salivary glands during chemically induced oral carcinogenesis.

Keywords: Carcinogenesis; Oral Cancer; Histopathology; Histomorphometry.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer continua sendo um importante problema de saúde pública. De acordo com estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), são esperados cerca de 781 mil novos casos por ano entre 2026 e 2028. Entre os homens, o câncer da cavidade oral representa 4,8% dos casos novos estimados, estando entre os tipos de câncer mais frequentes neste grupo (INCA, 2026). O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais frequente da cavidade oral, originando-se do epitélio escamoso. Embora possa acometer diferentes regiões da cavidade oral, apresenta maior predileção pela borda lateral da língua, pelo lábio inferior e pelo assoalho bucal. A doença acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino, especialmente a partir da quinta década de vida, com maior prevalência em indivíduos leucodermas (NEVILLE et al., 2016). O câncer de boca está entre as neoplasias mais prevalentes no mundo. Apesar dos avanços tecnológicos para o tratamento, o câncer de boca continua a apresentar um diagnóstico desfavorável com alta taxa de morbidade e mortalidade, sobretudo quando diagnosticado em estágios avançados (CHAMOLI et al., 2021). Dentre os principais fatores de risco, os mais comuns são o consumo de tabaco, álcool, noz de bétele, dieta inadequada e má higiene oral, sendo o tabaco o mais significativo em escala global. O risco eleva-se de forma significativa com a exposição prolongada e combinada aos fatores predisponentes, sendo também evidenciada a participação de componentes genéticos e a influência do microbioma oral (PERERA et al., 2018). A carcinogênese do carcinoma epidermóide oral (CEO) é um processo multifatorial, representado por alterações genéticas, epigenéticas e um microambiente tumoral desregulado. O tumor pode originar-se de lesões potencialmente malignas, clinicamente manifestadas como lesão ulcerada, com área central necrótica, circundada por bordas elevadas., e apresenta alta capacidade de invasão local e metástase linfonodal (CHEN et al., 2021, PIRES et al., 2013). Tendo em vista disso, o palato representa uma das localizações mais raras para o carcinoma epidermóide, eles estão entre as neoplasias locais mais agressivas, deixando para trás importantes deficiências morfofuncionais (PATRU et al, 2020). O diagnóstico do câncer oral advém de exames clínicos, exames de imagem, biópsia do tecido suspeito e análises histopatológicas. Tecnologias emergentes, como biomarcadores salivares e análise do microbioma, estão sendo estudadas para possibilitar um diagnóstico precoce, para assim

contribuir com a redução da incidência de mortalidade associada a uma doença tão prevalente (BUGSHAN; FAROOQ, 2020). Atualmente, diversos tratamentos estão disponíveis para o CEO, sendo as intervenções cirúrgicas, geralmente a primeira linha terapêutica, seguida, quando necessário, de radioterapia e quimioterapia. Além disso, terapias-alvo, com o uso de anticorpo cetuximabe, e a imunoterapia emergem como opções promissoras. Apesar desses avanços, a sobrevida em doença avançada permanece em cerca de 50% (TAN et al., 2023), evidenciando a necessidade contínua de estudos para melhoria das condições de tratamento. Diante da relevância do conhecimento sobre o processo de carcinogênese oral para a melhoria das condições de tratamento e do prognóstico dos pacientes acometidos por essa enfermidade, o presente estudo tem como objetivo analisar, descritiva e comparativamente, as características histopatológicas e realizar a mensuração histomorfométrica das lesões em ductos excretores de glândulas salivares menores palatinas durante o processo de indução química da carcinogênese oral.

Metodologia

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização do estudo

Esta pesquisa consistiu em uma análise histopatológica descritiva e comparativa das alterações dos ductos excretores das glândulas salivares menores de palato duro e mole, quimicamente induzidas pelo 4-NQO em ratos.

2.2 Animais experimentais

Foram utilizados 50 ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 250 g, oriundos do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, providas de bebedouro e comedouro, sendo mantidos 3 ou 4 animais por gaiola. Sendo submetidos a condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e iluminação, em ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, com fornecimento de ração e água ad libitum. O peso de cada animal foi aferido a cada 7 dias. O consumo de água e ração por gaiola foi acompanhado diariamente durante as 37 semanas experimentais.

2.3 Delineamento experimental

A amostra foi dividida em 10 animais destinados ao grupo controle (GC) e 40 ao grupo experimental. Os animais do grupo experimental foram acompanhados por um período máximo de 37 semanas, durante o qual foram submetidos à indução química da carcinogênese oral. Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados para a coleta das lesões da cavidade oral e posterior análise histopatológica.

2.4 Indução da carcinogênese

Foi utilizado o agente carcinógeno 4-NQO (4-nitroquinolina-1-óxido), diluído na água disponibilizada aos animais do grupo experimental, conforme protocolo descrito por Supsavhad et al. (2016). Após o período experimental de até 37 semanas, os animais foram sacrificados por meio de injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 5% e xilazina 2%, na dose de 0,3 mL/100 g. (Figura 1).

2.5 Avaliação clínica e microscópica

Após o sacrifício dos animais, realizou-se a coleta e o registro fotográfico das lesões presentes na cavidade oral para avaliação macroscópica. Realizaram-se as medidas das lesões, permitindo sua caracterização e documentação antes do processamento histológico. A análise histopatológica foi realizada inicialmente para confirmar a presença de carcinoma epidermóide ou de lesões potencialmente malignas do palato, incluindo leucoplasias e displasias epiteliais orais. Posteriormente, foram avaliadas às alterações presentes nos ductos excretores das glândulas salivares menores do palato duro e mole, relacionadas ao processo de indução química da carcinogênese oral.

2.6 Processamento histológico

Após a coleta, as lesões foram imersas em formaldeído a 10% para fixação. Em seguida, procedeu-se ao processamento do material para inclusão em parafina e posteriormente submetido à secção em micrótomo. As lâminas obtidas foram destinadas à análise histopatológica e histomorfométrica das alterações presentes nos ductos excretores das glândulas salivares menores de palato duro e mole. A análise foi realizada por meio de microscopia óptica, utilizando microscópio OPTIKA-Italy. As alterações observadas serão fotografadas por meio de sistema de captura de imagem com câmera acoplada, também da marca OPTIKA-Italy, permitindo a análise criteriosa das alterações ductais.

2.7 Análise morfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada a partir das lâminas obtidas após o processamento histológico, com avaliação das alterações dos ductos excretores das glândulas salivares menores localizadas no palato duro e mole. As imagens obtidas por meio do sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio óptico OPTIKA-Italy, permitiram a documentação e avaliação das alterações histológicas observadas.

2.8 Análise estatística

Os dados coletados foram inicialmente armazenados em planilha específica do Microsoft Excel e posteriormente transportados para o programa estatístico SPSS 20.0 (IBM). Inicialmente, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnoff para verificar a normalidade dos dados obtidos. Os dados que apresentaram distribuição não paramétrica, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (KW). Para dados paramétricos, foi utilizado o teste ANOVA (F). Para a verificação de possíveis correlações entre as variáveis, foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

2.9 Materiais e equipamentos

2.9.1 Materiais de consumo

- Ração para animais de laboratório;
- Água para consumo dos animais;
- 4-NQO (4-nitroquinolina-1-óxido);
- Formaldeído a 10%;
- Parafina;
- Cloridrato de cetamina 5%;
- Xilazina 2%.

2.9.2 Materiais e equipamentos utilizados

- Caixas de polipropileno;

- Bebedouros;
- Comedouros;
- Micrótomo;
- Microscópio óptico OPTIKA-Italy;
- Sistema de captura de imagens com câmera acoplada OPTIKA-Italy;
- Computador;
- Microsoft Excel;
- Programa estatístico SPSS 20.0 (IBM).

2.10 Implicações éticas

O protocolo experimental foi submetido à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O presente trabalho pertence ao projeto aprovado no Edital Universal do CNPq 2021 (nº 409414/2021-2), intitulado "Estudo clínico patológico e imunohistoquímico da evolução de carcinomas epidermóides orais induzidos quimicamente em ratos". O projeto foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), sob o número 051/2022.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS

O estudo analisou a presença ou ausência de alterações nos ductos excretores das glândulas salivares menores de palato duro e mole. Na avaliação da hiperplasia ductal, foram observados os padrões em placa, caracterizado pela presença de células basalóides, intraductal com formação de pontes e estratificação colunar. Também foram avaliadas a presença de metaplasia ductal, considerando os tipos mucosa, sebácea, escamosa e de células claras, além da presença ou ausência de displasia ductal e acúmulo de muco.

3.1 Hiperplasia Ductal por semana de indução

Dos 44 animais analisados, 38,6% apresentaram hiperplasia ductal (n=17) e 61,4% não apresentaram alteração (n=27), como observado na Tabela 1 e figura 2. Entre os animais com hiperplasia, 20,5% apresentaram hiperplasia em placa com células basalóides (n=9), 11,4% apresentaram hiperplasia intraductal com formação de pontes (n=5) e 6,8% apresentaram estratificação colunar (n=3) como observado na tabela 2 e figura 3.

Em relação às semanas de indução, na 8ª semana, foram avaliados 5 animais, dos quais 80% apresentaram hiperplasia ductal (n=4), sendo 20% em placa com células basalóides (n=1), 40% intraductal com formação de pontes (n=2) e 20% com estratificação colunar (n=1). Na 12ª semana, dos 5 animais avaliados, 20% apresentaram hiperplasia ductal (n=1), do tipo intraductal com formação de pontes. Na 16ª e 19ª semanas, nenhum dos animais avaliados apresentou hiperplasia ductal (0%; n=0). Na 20ª semana, dos 3 animais avaliados, 66,7% apresentaram hiperplasia ductal (n=2), sendo 33,3% em placa com células basalóides (n=1) e 33,3% com estratificação colunar (n=1). Na 22ª semana, o único animal avaliado apresentou hiperplasia ductal (100%; n=1), do tipo em placa com células basalóides. Na 23ª semana, dos 7 animais avaliados, 14,3% apresentaram hiperplasia (n=1), do tipo em placa com células basalóides. Na 24ª e 25ª semanas, nenhum

dos animais avaliados apresentou hiperplasia ductal (0%; n=0). Na 26ª semana, o único animal avaliado apresentou hiperplasia ductal (100%; n=1), do tipo em placa com células basalóides. Na 27ª semana, dos 5 animais avaliados, 60% apresentaram hiperplasia (n=3), sendo 20% em placa com células basalóides (n=1), 20% intraductal com formação de pontes (n=1) e 20% com estratificação colunar (n=1). Na 28ª semana, dos 2 animais avaliados, 50% apresentaram hiperplasia (n=1), do tipo em placa com células basalóides. Por fim, na 30ª semana, os 3 animais avaliados apresentaram hiperplasia (100%; n=3), sendo 66,7% em placa com células basalóides (n=2) e 33,3% intraductal com formação de pontes (n=1).

De modo geral, a hiperplasia ductal esteve presente em diferentes semanas de indução, com predominância da hiperplasia em placa com células basalóides, seguida da hiperplasia intraductal com formação de pontes e da estratificação colunar, sem evidência de um padrão progressivo de aumento da alteração ao longo das semanas.

3.2 Metaplasia ductal por semana de indução

Dos 44 animais analisados, 40,9% apresentaram metaplasia ductal (n=18), enquanto 59,1% não apresentaram a alteração (n=26). Entre os animais com metaplasia, 13,6% apresentaram metaplasia mucosa (n=6), 22,7% apresentaram metaplasia escamosa (n=10), 2,3% apresentaram metaplasia sebácea (n=1) e 2,3% apresentaram metaplasia por células claras (n=1). Como observado na tabela 3 e figura 5.

Em relação às semanas de indução, na 8ª semana, foram avaliados 5 animais, dos quais 40% apresentaram metaplasia ductal (n=2), sendo 40% com metaplasia escamosa (n=2). Na 12ª e 25ª semanas, nenhum dos animais avaliados apresentou metaplasia ductal (0%; n=0). Na 16ª semana, dos 5 animais avaliados, 20% apresentaram metaplasia (n=1), do tipo mucosa. Na 19ª semana, dos 2 animais avaliados, 50% apresentaram metaplasia (n=1), também do tipo mucosa. Na 20ª semana, dos 3 animais avaliados, 33,3% apresentaram metaplasia (n=1), do tipo mucosa. Na 22ª semana, o único animal avaliado apresentou metaplasia ductal (100%; n=1), do tipo mucosa. Na 23ª semana, dos 7 animais avaliados, 42,9% apresentaram metaplasia (n=3), sendo 28,6% com metaplasia escamosa (n=2) e 14,3% com metaplasia por células claras (n=1). Na 24ª semana, dos 4 animais avaliados, 50% apresentaram metaplasia (n=2), sendo 25% do tipo mucosa (n=1) e 25% do tipo escamosa (n=1). Na 26ª semana, o único animal avaliado apresentou metaplasia (100%; n=1), do tipo sebácea. Na 27ª semana, dos 5 animais avaliados, 40% apresentaram metaplasia ductal (n=2), sendo 20% do tipo mucosa (n=1) e 20% do tipo escamosa (n=1). Na 28ª semana, dos 2 animais avaliados, 50% apresentaram metaplasia (n=1), do tipo escamosa. Por fim, na 30ª semana, os 3 animais avaliados apresentaram metaplasia ductal (100%; n=3), todos do tipo escamosa (n=3). Como observado na tabela 4 e figura 6.

De modo geral, a metaplasia escamosa foi o tipo mais frequente, presente em 10 dos 44 animais (22,7%), seguida pela metaplasia mucosa, observada em 6 animais (13,6%). As metaplasias sebáceas e por células claras foram menos frequentes, com 1 caso cada (2,3%). A ocorrência dos diferentes tipos variou entre as semanas de indução, sem evidência de um padrão progressivo definido ao longo do período analisado.

3.3 Displasia ductal por semana de indução

Dos 44 animais analisados, 31 (70,5%) não apresentaram displasia ductal, enquanto 13 (29,5%) apresentaram. A distribuição variou entre as semanas de indução. Na 8ª semana, foram avaliados 5 animais, dos quais 40% apresentaram displasia (n=2). Nas semanas 12ª, 16ª e 19ª, todos os animais avaliados (5, 5 e 2, respectivamente) não apresentaram alteração (0%; n=0). Na 20ª semana, 33,3% dos animais apresentaram displasia (n=1). Na 22ª semana, o único animal avaliado não apresentou alteração (0%; n=0). Na 23ª semana, 42,9% dos animais apresentaram displasia (n=3), enquanto na 24ª semana, 50% apresentaram (n=2). Nas semanas 25ª e 28ª, nenhum caso de displasia foi observado (0%; n=0). Já na 26ª semana, o único animal avaliado apresentou a alteração (100%; n=1). Na 27ª semana, 60% dos animais apresentaram displasia (n=3), enquanto na 30ª semana, 33,3% apresentaram a alteração (n=1). Como é possível visualizar na tabela 5 e figura 8.

3.4 Acúmulo de muco por semana de indução

Dos 44 animais analisados, 10 (22,7%) não apresentaram acúmulo de muco no ducto, enquanto 34 (77,3%) apresentaram. A alteração foi observada em diferentes períodos de indução. Na 8ª semana, os 5 animais avaliados apresentaram acúmulo de muco (100%; n=5). Na 12ª semana, 60% (n=3) dos 5 animais avaliados apresentaram a alteração, enquanto na 16ª semana, 80% (n=4) dos 5 animais apresentaram. Nas semanas 19ª, 20ª e 22ª, todos os animais avaliados apresentaram a alteração (100%; n=2, n=3 e n=1, respectivamente). Na 23ª semana, 71,4% (n=5) dos 7 animais apresentaram acúmulo de muco, enquanto na 24ª semana, 50% (n=2) dos 4 animais apresentaram. Nas semanas 25ª e 26ª, o único animal avaliado em cada período apresentou a alteração (100%; n=1 em ambas). Na 27ª semana, 40% (n=2) dos 5 animais apresentaram acúmulo de muco. Nas semanas 28ª e 30ª, todos os animais avaliados apresentaram alteração (100%; n=2 e n=3, respectivamente). Como observado na tabela 6 e figura 10.

4. DISCUSSÃO

A análise histopatológica das glândulas salivares menores do palato revelou alterações ductais, como hiperplasia, metaplasia, displasia e acúmulo de muco, ao longo do período de indução. Esses achados indicam que a exposição ao 4NQO promoveu alterações morfológicas nas estruturas glandulares, além das observadas no epitélio oral, corroborando seu uso como modelo experimental de carcinogênese oral (Zigmundo et al., 2022). Em relação a hiperplasia ductal apresentou distribuição variável ao longo das semanas de indução, sem comportamento linear. A maior frequência proporcional foi observada em 30 semanas, quando os três animais avaliados apresentaram a alteração, enquanto não foram identificados casos nas semanas 16, 19, 24 e 25. Esses achados sugerem que a hiperplasia pode representar uma resposta adaptativa do epitélio ductal ao estímulo carcinogênico, porém sua ocorrência em diferentes períodos não permite estabelecer uma relação direta entre o maior tempo de exposição e a intensificação da alteração. Alterações hiperplásicas dos ductos das glândulas salivares já foram descritas em associação a lesões orais e à exposição a agentes químicos ou irritação persistente (Mohan et al., 2016). A metaplasia ductal foi identificada em 18 dos 44 animais (40,9%), apresentando frequência ligeiramente superior à hiperplasia. A presença de metaplasia, especialmente do padrão escamoso, é relevante no contexto da carcinogênese experimental, pois pode refletir alterações na diferenciação do epitélio ductal diante de estímulos químicos persistentes. Entretanto, assim como a hiperplasia, a metaplasia é

considerada uma alteração adaptativa e, isoladamente, não deve ser interpretada como evidência de transformação maligna (Mohan et al., 2016).

Entre os achados avaliados, a displasia ductal apresentou-se em 13 dos 44 animais (29,5%). Embora sua frequência tenha sido inferior à observada para hiperplasia e metaplasia, sua presença possui maior relevância no contexto da carcinogênese, uma vez que a displasia envolve alterações citológicas e arquiteturais mais significativas. A ausência desse achado em determinados períodos também demonstra que sua ocorrência não acompanhou uma progressão temporal contínua. Esse resultado encontra respaldo em estudos experimentais anteriores. A literatura mostra estudos que avaliaram as glândulas salivares menores de ratos submetidos à indução de carcinogênese por 4NQO e identificaram alterações nos ductos, incluindo displasia ductal, principalmente em períodos mais prolongados de exposição (Vered et al., 2003). Outro achado bastante expressivo foi o acúmulo de muco nos ductos, identificado em 34 dos 44 animais (77,3%), sendo a alteração mais frequente entre todas as variáveis analisadas. O acúmulo de muco esteve presente desde as primeiras semanas e permaneceu frequente ao longo do experimento, alcançando 100% dos animais nas semanas 8, 19, 22 e 30. O acúmulo de muco em carcinomas palatinos não é apenas um achado morfológico, mas um biomarcador funcional: a composição, a intensidade e o tipo de mucina produzida refletem o grau tumoral, a via de carcinogênese e o prognóstico, fundamentando a aplicação de perfis mucinosos no diagnóstico diferencial e na estratificação de risco (Alos et al., 2005).

De maneira geral, os resultados demonstram que as glândulas salivares menores do palato apresentaram um conjunto diversificado de alterações morfológicas, com destaque para o acúmulo de muco, seguido pela metaplasia e pela hiperplasia ductal. Contudo, a distribuição dos achados entre as diferentes semanas não apresentou uma tendência progressiva uniforme. Assim, os resultados parecem indicar que as glândulas salivares palatinas respondem ao estímulo carcinogênico por meio de diferentes padrões de adaptação e alteração celular, que podem ocorrer em momentos distintos durante o processo de carcinogênese.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que as glândulas salivares menores do palato apresentaram diferentes alterações histopatológicas ao longo do período de indução da carcinogênese oral, incluindo hiperplasia ductal, metaplasia ductal, displasia ductal e acúmulo de muco. Entre os achados, o acúmulo de muco foi o mais frequente, estando presente em 34 dos 44 animais avaliados, seguido pela metaplasia ductal, observada em 18 animais, e pela hiperplasia ductal, identificada em 17 animais. A displasia ductal foi observada em 13 animais, evidenciando a ocorrência de alterações morfológicas mais significativas no epitélio ductal. A distribuição dos achados entre as diferentes semanas de indução não apresentou um padrão temporal linear, indicando que as alterações ductais ocorreram de

maneira variável ao longo do processo experimental. Dessa forma, os resultados sugerem que as glândulas salivares menores do palato podem apresentar diferentes respostas morfológicas diante da exposição ao agente carcinogênico, envolvendo alterações adaptativas, metaplásicas e displásicas. Esses achados reforçam a importância da avaliação das glândulas salivares menores na investigação da carcinogênese oral experimental, contribuindo para uma melhor compreensão das alterações que podem ocorrer nos tecidos glandulares durante esse processo.

Referências

6. REFERÊNCIAS

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2026: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2026. Disponível em:https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa. Acesso em: 23 ago. 2026.
2. NEVILLE, Braw W. et al. Patologia Oral e Maxilofacial. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Guanabara Koogan, 2016, 2021. 912 p. ISBN 9788535265644.
3. SUPSAVHAD W, WESSEL P. DIRKSEN WP, MARTIN CK, ROSOL TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. The Veterinary Journal. 2016; 210: 7–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.006.
4. ZIGMUNDO, Gisele Corrêa de Oliveira et al. 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) induced oral carcinogenesis: A systematic literature review. Pathology, Research and Practice, v. 236, n. 153970, p. 153970, 2022.
5. MOHAN, Sunil Paramel et al. Minor salivary gland changes in oral epithelial dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma - A histopathological study. Journal of Clinical and Diagnostic Research, v. 10, n. 7, p. ZC12-5, 2016.
6. VERED, Marilena et al. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. Oral Oncology, v. 39, n. 5, p. 491–496, 2003.
7. ALOS, Llucia et al. Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. The American Journal of Surgical Pathology, v. 29, n. 6, p. 806–813, 2005.
8. CHAMOLI, Ambika et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. Oral oncology, v. 121, n. 105451, p. 105451, 2021.
9. CHEN, Shang-Hung et al. New insights into oral squamous cell carcinoma: From clinical aspects to molecular tumorigenesis. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 5, p. 2252, 2021.
10. PERERA, M. et al. Inflammatory bacteriome and oral squamous cell carcinoma. Journal of dental research, v. 97, n. 6, p. 725–732, 2018.
11. PIRES, Fábio Ramôa et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. Journal of applied oral science, v. 21, n. 5, p. 460–467, 2013

12. TAN, Yunhan et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. International journal of oral science, v. 15, n. 1, p. 44, 2023.
13. PĂTRU A, ŞURLIN V, MĂRGĂRITESCU C, CIUCĂ EM, MATEI M, ŞERBĂNESCU MS, CAMEN A. Analysis of the distribution and expression of some tumor invasiveness markers in palate squamous cell carcinomas. Rom J Morphol Embryol. 2020 Oct-Dec;61(4):1259-1278. doi: 10.47162/RJME.61.4.27.

Anexos



Figura 1 – Sequência do protocolo de indução: A. Administração de 4NQO em água de beber; B. Eutanásia; C. Remoção e fixação do palato em formol a 10%; D. Preparo das lâminas para análise histológica das glândulas salivares palatinas.



Tabela 1 - Hiperplasia ductal



Figura 2 - Hiperplasia Ductal



Tabela 2 - Tipo de hiperplasia ductal



Figura 3 - Tipo de hiperplasia Ductal



Figura 4 - Seta: Hiperplasia ductal



Tabela 3 - Metaplasia ductal



Figura 5 - Metaplasia ductal



Tabela 4 - Tipos de metaplasia ductal



Figura 6 - tipos de metaplasia ductal



Figura 7 - Seta: Metaplasia Mucosa em ducto de glândula salivar menor de palato.



Tabela 5 - Displasia ductal



Figura 8 - Displasia Ductal



Figura 9 - Seta: Displasia ductal



Tabela 6 - Acúmulo de muco



Figura 10 - Acúmulo de Muco



Figura 11 - Acúmulo de muco dentro do ducto da glândula com dilatação (Ectasia) ductal



Artigo publicado que é fruto de nossa pesquisa. https://doi.org/10.1007/s10735-026-10938-5

CÓDIGO: SB0587

AUTOR: BEATRIZ SARAIVA DE RESENDES

COAUTOR: KAHULA CAMARA DA COSTA

ORIENTADOR: JANE CARLA DE SOUZA

TÍTULO: FATORES CRONONUTRICIONAIS E SAÚDE INTESTINAL EM PESSOAS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 está associado a diversas complicações gastrointestinais que podem comprometer a qualidade de vida e o manejo da doença. Paralelamente, evidências apontam que comportamentos crononutricionais inadequados podem influenciar processos metabólicos e gastrointestinais. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre comportamentos crononutricionais e sintomas gastrointestinais em indivíduos com DM2. Trata-se de um estudo quantitativo, observacional e transversal, realizado com 85 adultos com diagnóstico de DM2 residentes em Santa Cruz-RN. A saúde gastrointestinal foi avaliada por meio do Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) e os comportamentos crononutricionais pelo Questionário de Perfil Crononutricional (CP-Q). As associações foram investigadas por meio da correlação de Spearman e do teste de Mann-Whitney, adotando-se $p<0,05$. Observou-se que a menor frequência de consumo do café da manhã esteve associada a maiores escores de refluxo, dor abdominal e sintomas gastrointestinais totais. Maior frequência de comer noturno associou-se à maior intensidade de dor abdominal. O jetlag social correlacionou-se positivamente com refluxo, enquanto a tendência à vespertinidade associou-se a maiores escores de refluxo e indigestão. Além disso, indivíduos que relataram pular o café da manhã apresentaram maiores escores totais de sintomas gastrointestinais. Conclui-se que comportamentos crononutricionais associados ao desalinhamento circadiano

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2. Crononutrição. Sintomas gastrointestinais.

TITLE: Type 2 diabetes mellitus. Chrononutrition. Gastrointestinal symptoms.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with several gastrointestinal complications that may impair quality of life and disease management. Simultaneously, evidence suggests that inadequate chrononutrition behaviors may influence metabolic and gastrointestinal processes. Therefore, this study aimed to evaluate the association between

chrononutrition behaviors and gastrointestinal symptoms in individuals with T2DM. This was a quantitative, observational, and cross-sectional study conducted with 85 adults diagnosed with T2DM living in Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil. Gastrointestinal health was assessed using the Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS), and chrononutrition behaviors were evaluated using the Chrononutrition Profile Questionnaire (CP-Q). Associations were investigated using Spearman's correlation and the Mann–Whitney test, adopting a significance level of $p < 0.05$. A lower frequency of breakfast consumption was associated with higher reflux, abdominal pain, and total gastrointestinal symptom scores. A higher frequency of night eating was associated with greater abdominal pain intensity. Social jetlag was positively correlated with reflux, while an evening chronotype tendency was associated with higher reflux and indigestion scores. Furthermore, individuals who reported skipping breakfast presented higher total gastrointestinal symptom scores. In conclusion, chrononutrition behaviors related to circadian misalignment were associated with greate

Keywords: Type 2 diabetes mellitus. Chrononutrition. Gastrointestinal symptoms.

Introdução

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença crônica caracterizada por alterações na secreção e/ou ação da insulina, resultando em hiperglicemia persistente (ADA, 2024a). No Brasil, destaca-se entre as principais doenças crônicas não transmissíveis, sendo responsável por aproximadamente 5% da carga total de doenças no país (Costa et al., 2017). Além disso, apresenta elevada taxa de subnotificação e um importante impacto econômico sobre o sistema público de saúde (Muzy et al., 2021).

Entre as complicações associadas ao DM2, destacam-se alterações gastrointestinais, como a enteropatia diabética, relacionada a manifestações como constipação, episódios de diarreia e incontinência fecal (Maisey, 2016), além da gastroparesia, caracterizada por náuseas, vômitos, sensação de plenitude pós-prandial, distensão e dor abdominal. Adicionalmente, indivíduos com diabetes apresentam maior risco de refluxo gastroesofágico, disbiose intestinal e alterações da permeabilidade intestinal, condições associadas ao agravamento do estado inflamatório e da resistência à insulina (Santos Filho et al., 2022).

Nesse contexto, fatores relacionados à organização temporal do organismo vêm sendo associados ao metabolismo glicídico e ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. O sistema de temporização circadiano é composto por osciladores biológicos interligados responsáveis por gerar e regular ritmos diários, como o ciclo sono-vigília, a ingestão alimentar, o metabolismo energético e a secreção hormonal, sincronizados principalmente pelo ciclo claro-escuro (Franzago et al., 2023). Entretanto, o estilo de vida contemporâneo tem favorecido a desregulação desses ritmos, comprometendo a homeostase metabólica (Jiao; Kalsbeek; Yi, 2024). Além disso, comportamentos alimentares inadequados, como pior qualidade da dieta, alterações na distribuição de macronutrientes e realização tardia das refeições, também estão associados ao aumento do risco de doenças metabólicas, incluindo o DM2 (Mota et al., 2019).

Diante disso, a crononutrição surge como uma área que investiga a interação entre alimentação, ritmos circadianos e metabolismo, considerando que diferentes funções metabólicas sofrem influência da organização temporal do organismo (Johnston et al., 2016). Nesse contexto, evidências recentes demonstram que comportamentos crononutricionais inadequados, como omissão do café da manhã (Quadra et al., 2022), horários irregulares das refeições, distribuição alimentar inadequada ao longo do dia (Rovira-Llopis et al., 2024), ingestão tardia de carboidratos (Verde et al., 2024) e jet lag alimentar (Meléndez-Fernández & Nelson, 2023), estão associados a pior controle glicêmico e maior risco de desenvolvimento do DM2.

No entanto, ainda são escassos os estudos que investigam a associação entre comportamentos crononutricionais e sintomas gastrointestinais em indivíduos com DM2, especialmente em contextos regionais e populacionais específicos. Dessa forma, permanece pouco elucidado se padrões alimentares desalinhados ao ritmo biológico podem contribuir para o agravamento das manifestações gastrointestinais nessa população. Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa é avaliar a relação entre os sintomas gastrointestinais e comportamentos crononuntricionais em pessoas com diabetes mellitus tipo 2.

Metodologia

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, de delineamento transversal, desenvolvido a partir de dados provenientes do projeto de mestrado intitulado “Associação entre fatores cronobiológicos, clínicos e sociodemográficos com controle glicêmico em pessoas com diabetes mellitus tipo 2”. O presente estudo caracteriza-se como uma investigação derivada desse projeto, realizada no município de Santa Cruz, Rio Grande do Norte.

Foram incluídos indivíduos adultos (≥18 anos) com diagnóstico de DM2 e residentes no município. Foram excluídos participantes com distúrbios, comorbidades ou condições de trabalho e de vida capazes de interferir nos padrões de sono, como fibromialgia, câncer, trabalho noturno ou em turnos alternados, além de gestantes e lactantes.

O cálculo amostral foi realizado com base na estimativa populacional do município para o ano de 2021, correspondente a 28.392 habitantes, segundo dados do Ministério da Saúde. Considerando-se uma prevalência de 5,5% para DM2, obtida a partir de informações do e-SUS e da Secretaria Municipal de Saúde, estimou-se uma amostra mínima de 80 participantes, adotando-se intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%. O cálculo foi realizado por meio da calculadora online OpenEpi (http://www.openepi.com/).

A amostragem foi não probabilística, por conveniência. O recrutamento ocorreu nas seis Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município, durante os atendimentos do programa Hiperdia. Foram utilizadas estratégias de divulgação por meio de redes sociais (Instagram), rádio e cartazes, com o objetivo de ampliar a captação de indivíduos elegíveis.

A coleta de dados foi realizada por entrevistador previamente treinado entre abril e julho de 2024. Todas as entrevistas foram realizadas de forma presencial e individual, em ambiente reservado, visando assegurar a privacidade dos participantes, sendo conduzidas nas UBS do município ou na Clínica-Escola de Nutrição da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi (FACISA). A avaliação da saúde gastrointestinal foi realizada por meio do Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS), instrumento desenvolvido por Svedlund, Sjödin e Dotevall (1988) e traduzido e validado para a língua portuguesa por Souza et al. (2016). O instrumento é composto por 15 itens respondidos em escala Likert de sete pontos, variando de 1 (ausência de desconforto) a 7 (desconforto muito intenso). O escore total foi obtido pela soma das pontuações atribuídas a cada item, refletindo a intensidade dos sintomas gastrointestinais relatados.

Os sintomas avaliados são distribuídos em cinco domínios: (1) dor abdominal, que inclui dor abdominal, dor de fome e náuseas; (2) refluxo, abrangendo pirose e refluxo; (3) indigestão, composta por ruídos hidroaéreos, distensão abdominal, eructações e flatulência; (4) constipação, que engloba constipação intestinal, fezes endurecidas e sensação de esvaziamento intestinal incompleto; e (5) diarreia, incluindo diarreia, fezes amolecidas e urgência evacuatória. Cada domínio foi calculado a partir da média dos escores dos sintomas correspondentes, conforme metodologia proposta por Revicki et al. (1997). Foram incluídas duas questões relacionadas ao hábito intestinal, contemplando a frequência evacuatória e o formato/consistência das fezes. Esta última variável foi avaliada por meio da Escala de Bristol, desenvolvida por Lewis e Heaton (1997) e validada para a língua portuguesa por Martins e Azevedo (2012).

Os comportamentos crononutricionais foram avaliados por meio do Questionário de Perfil Crononutricional (CPQ), proposto por Veronda et al. (2020) e traduzido e validado para a língua portuguesa por Lira et al. (2023). O instrumento é composto por 18 questões que permitem caracterizar diferentes aspectos do padrão alimentar, considerando separadamente os dias de trabalho e os dias livres.

A partir desse instrumento, foram obtidas variáveis relacionadas aos hábitos alimentares e aos horários das refeições. A frequência do café da manhã foi definida pelo número de dias da semana em que essa refeição era realizada, sendo considerada omissão do café da manhã quando o participante deixava de realizá-la pelo menos uma vez por semana. Também foi identificada a maior refeição do dia, classificada como café da manhã, almoço, jantar ou outra refeição. Além disso, foi avaliada a frequência de comer noturno, definida pelo número de dias da semana em que o indivíduo acordava para se alimentar, sendo considerada positiva quando esse comportamento ocorria pelo menos uma vez por semana. O jetlag alimentar foi calculado pela diferença entre o ponto médio da alimentação em dias livres e em dias de trabalho, considerando-se como ponto médio da alimentação o horário correspondente à metade do intervalo entre a primeira e a última refeição realizadas no dia.

Foram analisadas a latência noturna, definida como o intervalo, em horas, entre a última refeição e o horário de dormir; a janela alimentar, correspondente ao tempo decorrido, em horas, entre a primeira e a última refeição do dia; e o tempo decorrido entre a última refeição e o ponto médio do sono (TDM), calculado pela diferença, em horas, entre o ponto médio do sono e o horário da última refeição. Para obtenção da média semanal das variáveis latência noturna, janela alimentar e TDM, foi empregada a seguinte fórmula:

[(5 × dias de trabalho) + (2 × dias livres)] ÷ 7

Os dados foram analisados utilizando o software IBM SPSS Statistics, versão 23.0 para Windows. A distribuição das variáveis foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A associação entre os sintomas gastrointestinais e os comportamentos crononutricionais foi investigada por meio do teste de correlação de Spearman.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FACISA/UFRN, sob parecer consubstanciado nº 6.707.743. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da participação na pesquisa.

Resultados e Discussões

A amostra inicialmente recrutada foi composta por 92 indivíduos. Entretanto, 7 participantes foram excluídos da análise, sendo 5 por exercerem atividades laborais em turnos noturnos, 1 por apresentar diagnóstico de fibromialgia e 1 por não apresentar diagnóstico confirmado de DM2. Dessa forma, a amostra final foi constituída por 85 participantes. Observou-se predominância do sexo feminino (78,8%), enquanto 21,2% dos participantes eram do sexo masculino.

Em relação às características clínicas e aos hábitos de vida, a maioria dos participantes relatou não consumir bebidas alcoólicas (77,6%) e nunca ter fumado (67,1%). Quanto ao tratamento medicamentoso do DM2, verificou-se que 91,8% faziam uso de medicamentos antidiabéticos orais e 23,5% utilizavam insulina. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi a comorbidade mais frequente, estando presente em 56,5% da amostra, enquanto a neuropatia diabética foi a complicação mais prevalente, observada em 38,8% dos participantes. O tempo mediano de diagnóstico de DM2 foi de 6 anos (intervalo interquartil: 3–15 anos).

A avaliação da saúde gastrointestinal demonstrou pontuação mediana de 30 pontos no Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) (intervalo interquartil: 21–42). Além disso, a maioria dos indivíduos apresentou frequência evacuatória considerada adequada (81,0%) e fezes com formato e consistência adequados, de acordo com a Escala de Bristol (63,1%). Entre os domínios avaliados pelo GSRS, os sintomas relacionados à indigestão foram os mais frequentemente relatados, acometendo 35,3% dos participantes.

No que se refere aos comportamentos crononutricionais, observou-se que a maior parte dos indivíduos não relatou omissão do café da manhã (94,1%) e identificou o almoço como a principal refeição do dia (90,6%). Adicionalmente, 92,9% dos participantes apresentaram jetlag alimentar inferior a uma hora. Em relação à janela alimentar, verificou-se que 96,5% mantinham duração igual ou superior a 10 horas, com mediana de 12,5 horas (intervalo interquartil: 11,5–14,0 horas). Embora pouco frequente, o comportamento de comer noturno foi identificado em 11,8% da amostra.

As associações entre os comportamentos crononutricionais e os sintomas gastrointestinais foram avaliadas por meio de análises de correlação de Spearman e da comparação dos escores do GSRS entre os grupos, utilizando o teste de Mann–Whitney. Os resultados para a correlação de Spearman estão apresentados na figura 01.

Figura 01 - Associação entre comportamentos crononutricionais e saúde gastrointestinal em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Figura 01.Correlações de Spearman (rs) entre variáveis crononutricionais e sintomas gastrointestinais em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Barras azuis indicam correlação positiva (rs>0) e barras laranjas indicam correlação negativa (rs<0). Valores de p<0,05 indicam significância estatística.

Conforme apresentado na figura 01, a menor frequência de consumo do café da manhã foi correlacionada a maior intensidade dos sintomas gastrointestinais. Especificamente, observaram-se correlações negativas com os domínios de refluxo ($r_s = -0,270$; $p = 0,012$) e dor abdominal ($r_s = -0,214$; $p = 0,049$), bem como com o escore total dos sintomas gastrointestinais obtido pela escala GSRS ($r_s = -0,229$; $p = 0,035$).

Dessa forma, a associação observada entre a omissão do café da manhã e a maior intensidade dos sintomas gastrointestinais pode estar relacionada aos efeitos desse comportamento sobre a saúde metabólica e a organização temporal dos processos fisiológicos em indivíduos com DM2. Nesse sentido, Rebouças et al. (2022), em estudo transversal realizado com 107 indivíduos diagnosticados com DM2, observaram que o consumo regular do café da manhã contribui para a adoção de um padrão alimentar mais saudável, enquanto sua omissão esteve associada a piores desfechos metabólicos, incluindo níveis mais elevados de glicemia e índice de massa corporal.

Ademais, evidências indicam que elevações da glicemia podem afetar tanto a função motora do trato gastrointestinal quanto a percepção dos sintomas digestivos, aumentando a complacência gástrica proximal, retardando o esvaziamento gástrico e intensificando manifestações como plenitude pós-prandial, náuseas e distensão abdominal (Du etal., 2018).

Sob a perspectiva da crononutrição, essa associação também pode ser explicada pelo papel da alimentação na sincronização dos ritmos circadianos. Além da luz (Marhefkova et al., 2024), a ingestão alimentar atua como um importante sincronizador dos relógios periféricos presentes nos tecidos metabólicos e no trato gastrointestinal. Nesse contexto, o café da manhã exerce papel particularmente relevante por representar a primeira refeição após o prolongado tempo em jejum durante o sono, contribuindo para o ajuste temporal de funções relacionadas ao metabolismo, à secreção hormonal e à motilidade gastrointestinal (Sato & Sato, 2023).

Portanto, a menor frequência de realização do café da manhã observada neste estudo pode refletir um padrão alimentar irregular, no qual essa refeição é realizada em alguns dias e omitida em outros. Essa variabilidade pode fornecer sinais temporais inconsistentes ao sistema circadiano, potencialmente dificultando a sincronização dos

relógios periféricos e, consequentemente, interferindo na regulação das funções gastrointestinais.

Ressalta-se que o horário das refeições atua como um dos principais moduladores das oscilações diárias da microbiota intestinal e de seus metabólitos. Dessa maneira, a omissão do café da manhã pode promover um desalinhamento entre os ritmos circadianos e a microbiota intestinal, comprometendo a regulação metabólica e gastrointestinal e favorecendo alterações na homeostase da glicose, na sensibilidade à insulina e na função digestiva (Jakubowicz et al. 2024).

Adicionalmente, a associação entre a menor frequência de realização do café da manhã e a maior intensidade dos sintomas de refluxo observada neste estudo é consistente com achados da literatura. Em uma revisão sistemática, Zhang et al. (2021) identificaram associação entre hábitos alimentares irregulares, incluindo a omissão frequente do café da manhã e a realização de refeições ou lanches em horários noturnos, e a ocorrência de sintomas relacionados à doença do refluxo gastroesofágico. Segundo os autores, esses comportamentos podem contribuir para uma distribuição irregular da ingestão alimentar ao longo do dia, favorecendo a realização de refeições mais volumosas ou em horários inadequados, fatores potencialmente relacionados à presença e à intensidade dos sintomas gastroesofágicos. Embora esses achados sejam provenientes da população geral e não especificamente de indivíduos com DM2, eles oferecem suporte para a associação observada no presente estudo.Além disso, a menor frequência de consumo do café da manhã também esteve relacionada à maior intensidade de dor abdominal. Embora os mecanismos envolvidos nessa relação ainda não estejam completamente esclarecidos, estudos recentes têm associado a omissão dessa refeição a diferentes manifestações gastrointestinais, incluindo dor abdominal, constipação, distensão abdominal e diarreia (Zuhairini et al., 2026). Assim, nota-se uma associação entre ritmos biológicos e alterações no funcionamento gastrointestinal, decorrentes da irregularidade alimentar.

Por fim, considerando que a dor abdominal, o refluxo, a constipação, ou diarreia e os sintomas de indigestão compõem os domínios avaliados pelo GSRS, a associação observada entre a omissão do café da manhã e maiores escores totais do instrumento sugere um impacto mais abrangente desse comportamento sobre a saúde gastrointestinal. Portanto, a ocorrência concomitante de diferentes sintomas pode contribuir para a elevação do escore global do GSRS, refletindo uma pior condição gastrointestinal entre os indivíduos que omitem essa refeição.

Ademais, maior frequência de comer noturno esteve positivamente associada ao domínio de dor abdominal (r_s = 0,228; p = 0,036), indicando maior intensidade desse sintoma entre os indivíduos que relataram esse comportamento. Embora as evidências sobre essa associação ainda sejam limitadas, um estudo experimental realizado com 115 adultos saudáveis, demonstrou que a ocorrência dos sintomas gastrointestinais varia de acordo com a fase circadiana, sendo mais frequente durante a noite biológica e nas primeiras horas da manhã (Zitting et al., 2024). Assim, esse mecanismo pode contribuir para explicar a associação observada no presente estudo entre o comer noturno e a maior intensidade de dor abdominal.

O jetlag social apresentou correlação positiva com o domínio de refluxo (r_s = 0,257; p = 0,018). De forma semelhante, indivíduos com tendência à vespertinidade apresentaram

maior maiores intensidade de sintomas gastrointestinais nos domínios de refluxo (r_s = 0,241; p = 0,026) e indigestão (r_s = 0,252; p = 0,020). Sendo assim, é importante ressaltar que além dos comportamentos alimentares, o cronotipo e o jetlag social também podem influenciar a saúde gastrointestinal, uma vez que refletem diferentes aspectos do alinhamento circadiano. Enquanto o cronotipo refere-se à preferência individual por horários de sono, vigília e realização das atividades diárias (Almoosawi et al., 2019), o jetlag social representa o desalinhamento entre o tempo biológico e as demandas sociais, sendo caracterizado por diferenças nos horários de sono entre dias úteis e dias livres (Costa; Soares; Almeida, 2023). Nesse contexto, nota-se que os achados deste estudo podem ser explicados pelo fato de que indivíduos vespertinos apresentam maior propensão à adoção de comportamentos de estilo de vida menos saudáveis, incluindo padrões alimentares irregulares, além de maior risco de desenvolver diabetes ao longo do tempo (Kiannersi et al., 2023).

Outrossim, evidências apontam que indivíduos com cronotipo vespertino tendem a concentrar maior consumo energético à noite, realizar refeições mais tardiamente e omitir o café da manhã com maior frequência (Van der Merwe; Münch; Kruger, 2022). Consequentemente, esses comportamentos podem favorecer o desalinhamento entre os horários de alimentação e o sistema de temporização circadiana, comprometendo processos fisiológicos relacionados à digestão e ao metabolismo e contribuindo para o agravamento dos sintomas gastrointestinais observados nesta população.

Embora ainda sejam limitadas as evidências sobre a relação entre cronotipo e sintomas gastrointestinais em indivíduos com DM2, estudos em outras populações com alterações gastrointestinais sugerem uma possível associação entre desalinhamento circadiano e alterações na saúde gastrointestinal. Chakradeo et al. (2018), em um estudo com 115 indivíduos com doença inflamatória intestinal e 76 controles saudáveis, observaram que o cronotipo vespertino, o jet lag social e a irregularidade nos horários das refeições estiveram associados a pior qualidade de vida relacionada à doença e a características clínicas mais graves. Esses achados apontam que alterações nos padrões temporais de sono e alimentação podem interferir na homeostase gastrointestinal, reforçando a hipótese de que comportamentos crononutricionais inadequados possam estar relacionados à maior ocorrência de sintomas gastrointestinais.

Além disso, os mecanismos que podem explicar essa associação estão relacionados ao papel dos ritmos circadianos na regulação das funções gastrointestinais. O trato gastrointestinal apresenta variações diurnas na motilidade, secreção gástrica, absorção de nutrientes, permeabilidade intestinal e microbiota, processos influenciados pelos horários de sono e alimentação, sendo assim, a desregulação circadiana pode comprometer a função gastrointestinal, favorecendo alterações como prejuízos na motilidade intestinal e maior susceptibilidade a distúrbios gastrointestinais (Voigt; Forsyth; Keshavarzian, 2019).

A comparação entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney revelou diferenças estatisticamente significativas nos escores totais do GSRS de acordo com alguns comportamentos crononutricionais. Observou-se que participantes que relataram pular o café da manhã apresentaram maiores escores de sintomas gastrointestinais quando comparados àqueles que realizavam essa refeição regularmente (p = 0,038). Além disso, diferenças significativas também foram observadas em relação à principal refeição do

dia (p = 0,032), sendo o almoço a refeição mais frequentemente apontada pelos participantes.

Embora esse resultado aponte uma possível relação entre a distribuição da ingestão alimentar ao longo do dia e a intensidade dos sintomas gastrointestinais, a interpretação deve ser realizada com cautela, uma vez que o delineamento transversal do estudo não permite estabelecer relações de causa e efeito. Ademais, não é possível determinar, a partir dessa análise, se considerar o almoço como principal refeição está associado a melhores ou piores desfechos gastrointestinais, indicando a necessidade de estudos adicionais para esclarecer os mecanismos envolvidos nessa associação.

Logo, em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese de que comportamentos alimentares desalinhados aos ritmos circadianos podem estar relacionados ao agravamento dos sintomas gastrointestinais em pessoas com DM2, uma vez que reforçam a necessidade de considerar não apenas a qualidade da alimentação, mas também os horários em que os alimentos são consumidos.

Nesse contexto, a crononutrição analisa como os horários das refeições podem influenciar os processos metabólicos e os ritmos biológicos, propondo o alinhamento alimentar ao sistema circadiano como estratégia para favorecer a homeostase e auxiliar na prevenção e no tratamento de doenças metabólicas (Sá; Duarte; Oliveira, 2026). Dessa forma, estratégias voltadas à regularidade das refeições, à manutenção do café da manhã e à redução de comportamentos que promovam desalinhamento circadiano podem representar abordagens complementares para a promoção da saúde gastrointestinal em indivíduos com DM2.

Por fim, ressalta-se que o delineamento transversal não permite estabelecer relações de causalidade entre as variáveis investigadas. A utilização de dados autorreferidos e de uma amostra de conveniência também pode limitar a precisão das informações e a generalização dos resultados. Adicionalmente, não pode ser descartada a influência de medicamentos utilizados pelos participantes sobre os sintomas gastrointestinais relatados.

Por outro lado, este estudo apresenta importante relevância visto que realiza a investigação de um tema ainda pouco explorado na literatura, especialmente em indivíduos com DM2. Destaca-se também a utilização de instrumentos validados para avaliação da saúde gastrointestinal e dos comportamentos crononutricionais, bem como a análise simultânea de diferentes aspectos da crononutrição, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da relação entre ritmos alimentares e saúde gastrointestinal nessa população.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que comportamentos crononutricionais estiveram associados à intensidade dos sintomas gastrointestinais em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. A menor frequência de consumo do café da manhã esteve relacionada a

maiores escores de refluxo, dor abdominal e sintomas gastrointestinais totais, enquanto o comer noturno associou-se à maior intensidade de dor abdominal. Adicionalmente, maiores níveis de jetlag social e a tendência à vespertinidade correlacionaram-se com maiores escores de refluxo e indigestão.

Esses achados sugerem que o desalinhamento entre os horários de alimentação, sono e os ritmos circadianos pode exercer influência sobre a saúde gastrointestinal de pessoas com DM2, reforçando a importância de considerar não apenas a qualidade e a composição da dieta, mas também os aspectos temporais da alimentação no acompanhamento nutricional dessa população. Nesse contexto, a crononutrição surge como uma abordagem promissora para complementar as estratégias tradicionais de manejo do diabetes, contribuindo potencialmente para a melhora da saúde metabólica e gastrointestinal.

Por fim, embora o delineamento transversal não permita estabelecer relações de causalidade, os resultados ampliam o conhecimento acerca da interação entre comportamentos crononutricionais e sintomas gastrointestinais em indivíduos com DM2, um tema ainda pouco explorado na literatura. Dessa forma, recomenda-se a realização de estudos longitudinais e de intervenção que permitam confirmar essas associações e elucidar os mecanismos envolvidos.

Referências

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE. 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. Diabetes Care, v. 47, s. 1, p. s20–S42, 2024a.

ALMOOSAWI, S. et al., Chronotype: implications for epidemiologic studies on chrono-nutrition and cardiometabolic health. Advances in Nutrition, v. 10, n. 1, p. 30-42, 2019. DOI: 10.1093/advances/nmy070. PMID: 30500869; PMCID: PMC6370261.

CHAKRADEO, P. S. et al. Chronotype, social jet lag, sleep debt and food timing in inflammatory bowel disease. Sleep Medicine, v. 52, p. 188-195, 2018.

COSTA, A. F. et al. Carga do diabetes mellitus tipo 2 no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 33, n. 2, 2017.

COSTA, C. C; SOARES, P. O; ALMEIDA, S. G. O papel da crononutrição nas desordens do metabolismo: uma revisão de literatura. Research, Society and Development, v. 12, n. 6, e15212642105, 2023. DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i6.42105.

DU, Y. T; et al. Gastrointestinal symptoms in diabetes: prevalence, assessment, pathogenesis, and management. Diabetes Care, Alexandria, v. 41, n. 3, p. 627–637, 2018. DOI: 10.2337/dc17-1536. FRANZAGO, M. et al. Chrono-nutrition: circadian

rhythm and personalized nutrition. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 3, p. 2571, 2023. DOI: 10.3390/ijms24032571.

JIAO, H.; KALS BEEK, A.; YI, C. X. Microglia, circadian rhythm and lifestyle factors. Neuropharmacology, v. 257, p. 110029, 2024. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2024.110029.

JOHNSTON, J. D. et al. Circadian rhythms, metabolism, and chrononutrition in rodents and humans. Advances in Nutrition, v. 7, n. 2, p. 399–406, 2016. DOI: 10.3945/an.115.010777.

KIANNERSI, S. et al. Chronotype, unhealthy lifestyle, and diabetes risk in middle-aged U.S. women: a prospective cohort study. Annals of Internal Medicine, Philadelphia, v. 176, n. 10, p. 1330–1339, out. 2023. DOI: 10.7326/M23-0728.

LEWIS, S.J.; HEATON, K. W. Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 32:9, 920-924, 1997.

LIRA, N.C.C.; et al. Translation, adaptation and validation of the Chrononutrition Profile – Questionnaire (CP-Q) in Brazilian Portuguese. Chronobiol. Int., v. 40, n. 4, p. 2023.

MAISEY, Abigail. A practical approach to gastrointestinal complications of diabetes. Diabetes Therapy, v. 7, n. 3, p. 379–386, 2016. DOI: 10.1007/s13300-016-0182-y.

MARTINEZ, A.P.; AZEVEDO, G.R. Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira, Revista Latino-Americana de Enfermagem, v. 20, n. 3, p. 583–589, 2012.

MARHEFKOVA, N. et al., Circadian dysfunction and cardio-metabolic disorders in humans. Frontiers in Endocrinology, Lausanne, v. 15, p. 1328139, 2024. DOI: 10.3389/fendo.2024.1328139. PMID: 38742195; PMCID: PMC11089151.

MELÉNDEZ-FERNÁNDEZ, O. H.; LIU, J. A.; NELSON, R. J. Circadian rhythms disrupted by light at night and mistimed food intake alter hormonal rhythms and metabolism. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 4, p. 3392, 2023. DOI: 10.3390/ijms24043392.

MOTA, M. C. et al. A. Association between social jetlag, food consumption and meal times in patients with obesity-related chronic diseases. PLOS ONE, v. 14, n. 2, e0212126, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0212126.

MUZY, J. et al. Prevalência de diabetes mellitus e suas complicações e caracterização das lacunas na atenção à saúde a partir da triangulação de pesquisas. Cadernos de Saúde Pública, v. 37, n. 5, 2021.

QUADRA, M. R. et al. Influência do sono e da crononutrição na hipertensão e diabetes: um estudo de base populacional. Cadernos de Saúde Pública, v. 38, n. 7, 2022.

REBOUÇAS, K. S. C.; et al. Omissão de refeições, estado nutricional e perfil metabólico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria, Madrid, v. 42, n. 3, p. 152–159, 2022.

REVICKI, D.A.; et al. Reliability and validity of the gastrointestinal symptom rating scale in patients with gastroesophageal reflux disease. Quality of Life Research, v. 7, p. 75-83, 1997.

ROVIRA-LLOPIS, S.; et al. Circadian alignment of food intake and glycaemic control by time restricted eating: A systematic review and meta-analysis. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, v. 25, p. 325–337, 2024.

SÁ, A. L. C. A.; DUARTE, M. E. DE F.; OLIVEIRA, E. C. R. Contribuição da crononutrição na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares - Revisão de literatura. A revista Multidisciplinar Integrada -REMI, v. 2, n. 04, 26 mar. 2026.

SANTOS FILHO, R. I. et al. Alterações gastrointestinais no Diabetes mellitus: revisão sistemática. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v. 8, n. 8, p. 60137-60149, ago. 2022.

SATO, T; SATO, S. Circadian regulation of metabolism: commitment to health and diseases. Endocrinology, Oxford, v. 164, n. 7, p. bqad086, 2023.

SOUZA, G. S.; et al. Translation and Validation of the Brazilian Portuguese Version of the Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) Questionnaire. Arquivor de Gastroenterologia, v. 53, n. 3, p. 146–151, 2016.

SVEDLUND, J.; SJÖDIN, I.; DOTEVALL, G. GSRS--a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. Digestive Disease Scince., v.33, p. 129-34, 1988.

VAN DER MERWE, C; MÜNCH, M; KRUGER, R. Chronotype differences in body composition, dietary intake and eating behavior outcomes: a scoping systematic review. Advances in Nutrition, v. 13, n. 6, p. 2357-2405, 2022.

VERDE, L.; et al. Chrononutrition in type 2 diabetes mellitus and obesity: A narrative review. Diabetes Metabolism Research, v. 40, n.2, 2024.

VERONDA, A.C.; et al. Development, validation and reliability of the Chrononutrition profile – questionnaire. Chronobiology International, v. 37, p. 375–394, 2020.

VOIGT, R. M.; FORSYTH, C. B.; KESHAVARZIAN, A. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, v. 13, n. 5, p. 411-424, 2019.

ZHANG, M.; et al. Dietary and lifestyle factors related to gastroesophageal reflux disease: a systematic review. Therapeutics and Clinical Risk Management, Auckland, v. 17, p. 305–323,

ZITTING, K. M.; et al. Eating during the biological night is associated with nausea. Sleep Health, v. 10, p. S144-S148, 2024.

ZUHAIRINI, Y.; et al. The association between skipping breakfast and gastrointestinal symptoms in adults: a scoping review. Indonesian Journal of Clinical Nutrition Physician, v. 7, n. 1, 2026.

Anexos



Figura 01

CÓDIGO: SB0598

AUTOR: ALANNY CAMILE CORDEIRO DE MELO

ORIENTADOR: NAISANDRA BEZERRA DA SILVA FARIAS

TÍTULO: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO TECIDUAL EM RINS DE RATOS ARTRÍTICOS TRATADOS COM FITOTERÁPICOS A BASE DE RHUS TOXICODENDRON

Resumo

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta centenas de pessoas no mundo inteiro. Caracteriza-se por uma inflamação sistêmica que pode comprometer diferentes órgãos e sistemas, contribuindo para o desenvolvimento de nefropatias e insuficiência renal. O presente trabalho tem como objetivo avaliar os níveis de estresse oxidativo e de inflamação tecidual em rins de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA) e tratados com fitoterápicos à base de Rhus toxicodendron nos aspectos morfofuncionais do rim, pela análise da densidade e morfometria glomerular, bem como, glomeruloesclerose e da fibrose renal. Foram utilizados 20 ratos machos, adultos da linhagem Holtzman (214,57g) divididos em quatro grupos: C (animais controle sem a artrite); A (animais artríticos sem tratamento); RT-D9 (animais artríticos tratados com Rhus toxicodendron na diluição D9) e A-Ib (animais artríticos tratados com Ibuprofeno). O tratamento experimental teve duração de 28 dias e, após este período os rins foram coletados e processados conforme a rotina histológica, e amostras foram coradas com HE (análise histopatológica), PAS (análises morfométricas e da glomeruloesclerose) e Tricrômico de Masson (análise da fibrose). Os resultados preliminares são expressos como média ±erro padrão com nível de significância $p<0,05$ pelo teste de Tukey e, observou-se peso corporal e renal semelhantes entre todos os grupos.

Palavras-chave: Artrite reumatoide; Rim; Morfofisiologia; Fitoterapia.

TITLE: EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS LEVELS AND TISSUE INFLAMMATION IN THE KIDNEYS OF ARTHRITIC RATS TREATED WITH RHUS TOXICODENDRON-BASED HERBAL MEDICINES

Abstract

Rheumatoid arthritis(RA) is an autoimmune disease characterized by systemic inflammation that can affect multiple organs and systems, potentially contributing to the development of nephropathies and renal insufficiency. The present study aimed to

evaluate oxidative stress levels and tissue inflammation in the kidneys of rats subjected to adjuvant-induced arthritis(AIA) and treated with herbal preparations based on Rhus toxicodendron, as well as to investigate renal morphofunctional alterations through the analysis of glomerular density and morphometry, glomerulosclerosis, and renal fibrosis.Twenty adult male Holtzman rats, with a mean body weight of 214.57 g, were used and divided into four experimental groups: C(control animals without arthritis);A(arthritic animals without treatment);RT-D9(arthritic animals treated with Rhus toxicodendron at D9 dilution);and A-I (arthritic animals treated with ibuprofen). The experimental treatment lasted 28 days. At the end of this period, the kidneys were collected and processed according to standard histological procedures. Tissue samples were stained with hematoxylin and eosin(HE) for histopathological analysis, periodic acid–Schiff(PAS) for morphometric and glomerulosclerosis analyses, and Masson's trichrome for the assessment of renal fibrosis. Preliminary results are expressed as mean ± standard error, with a significance level of $p < 0.05$, using Tukey's test. Similar body and kidney weights were observed among all experimental group

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Kidney; Morphophysiology; Phytotherapy.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, inflamatória e crônica, caracterizada, principalmente, pelo comprometimento das membranas sinoviais das articulações, podendo apresentar manifestações extra-articulares relevantes (KAPOOR; BATHON, 2018). A doença apresenta expressiva heterogeneidade clínica, com variações quanto à manifestação, gravidade, resposta terapêutica e prognóstico. Sua apresentação mais frequente consiste em poliartrite simétrica envolvendo pequenas e grandes articulações, geralmente de caráter crônico e progressivo. A persistência do processo inflamatório pode promover destruição articular, deformidades e comprometimento funcional, repercutindo negativamente na capacidade laboral e na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Consequentemente, a AR representa importante problema de saúde pública, associado a impactos pessoais, familiares e sociais, além de elevados custos diretos e indiretos (SCHNEIDER et al., 2004; CHERMONT et al., 2008; AZEVEDO; FERRAZ; CICONELLI, 2008; BOMBARDIER et al., 2012).

Embora o comprometimento articular constitua a principal característica da AR, a doença pode apresentar manifestações sistêmicas, incluindo alterações renais. O envolvimento dos rins pode ocorrer por meio de lesões glomerulares e tubulares, frequentemente de maneira subclínica, sendo identificado apenas mediante investigação laboratorial. Nesse contexto, o acompanhamento periódico da função renal, por meio da avaliação da creatinina sérica e de parâmetros urinários, é fundamental para a identificação precoce de alterações e para o adequado acompanhamento clínico dos pacientes (PATHAN; JOSHI, 2004; CONFORTI et al., 2021). As lesões renais correspondem a alterações estruturais ou funcionais que podem ser identificadas por marcadores laboratoriais ou exames de imagem e que podem ocorrer com ou sem redução da taxa de filtração glomerular (TFG) (HICKSON et al., 2014).

Entre os principais indicadores de lesão renal destaca-se a proteinúria, particularmente a albuminúria persistente, considerada importante marcador de comprometimento renal

(LEVEY et al., 2002; LEVIN et al., 2008). Outros achados incluem alterações no sedimento urinário, como hematúria e leucocitúria, além de modificações nos parâmetros bioquímicos séricos e urinários. Ressalta-se que indivíduos com TFG preservada, mas que apresentam marcadores de lesão renal, especialmente albuminúria, podem apresentar risco aumentado para o desenvolvimento e progressão da doença renal crônica (ISEKI, 2008). Entre as alterações histopatológicas renais descritas em pacientes com AR submetidos à biópsia estão a glomerulonefrite proliferativa mesangial, nefropatia membranosa, nefropatia por imunoglobulina A (IgA), glomerulonefrite, nefropatia analgésica, nefrite intersticial, amiloidose secundária e fibrose renal. Dentre essas alterações, a glomerulonefrite proliferativa mesangial apresenta elevada frequência (HICKSON et al., 2014; QIJING et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2025).

No que se refere ao tratamento, as drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) constituem um dos principais recursos terapêuticos disponíveis. A introdução dessas terapias modificou significativamente o manejo da AR nas últimas décadas, deslocando a abordagem anteriormente predominantemente sintomática para uma estratégia voltada ao controle da atividade inflamatória, à prevenção da progressão estrutural e à preservação da funcionalidade. Entre as DMARDs sintéticas, o metotrexato permanece como uma das principais opções terapêuticas, enquanto as DMARDs biológicas e outras terapias-alvo vêm ampliando as possibilidades de intervenção e demonstrando resultados relevantes no controle da doença (NAM et al., 2017; SMOLEN et al., 2017). Apesar dos avanços, medicamentos sintomáticos, como anti-inflamatórios não esteroides, além de medidas físicas e psicológicas, continuam sendo utilizados como estratégias complementares no manejo dos sintomas.

Metodologia

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs da UEM (parecer nº113/2013) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN (parecer nº 066/2019 - isento). O certificado de análise das plantas foi garantido pela empresa Schraibmann LTDA (Carapicuíba, SP). As formulações homeopáticas foram preparadas conforme a farmacotécnica descrita na farmacopéia homeopática brasileira 3ª edição.

Animais

Foram utilizados nesta pesquisa 20 ratos machos adultos (81 dias de idade) da linhagem Holtzman (Rattus norvegicus) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Os animais foram mantidos dos 50 aos 53 dias de idade (período de adaptação) em caixas de polipropileno no biotério do Departamento de Farmácia da UEM, com temperatura de 22±2ºC, ciclo de 12/12 horas de claro/escuro e receberam água e ração ad libitum Nuvilab (Nuvital, Colombo, PR, Brasil) (peso médio dos animais foi de 208,4±12,6g). Após este período, os animais foram divididos em quatro grupos (n=5) como segue: Grupo C: Animais controle (animais normais sem artrite); Grupo A: Animais artríticos sem tratamento; Grupo A-RT: Animais artríticos

tratados com Rhus toxicodendron na diluição D9 e; Grupo A-Ib: Animais artríticos tratados com Ibuprofeno.

Design experimental para indução da artrite

Os animais dos grupos artríticos foram induzidos à artrite por dose única de injeção subcutânea de 100 µL de suspensão de ACF® - Adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), na região plantar da pata posterior esquerda. Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, porém foi administrado 0,1mL do veículo (óleo mineral) (Nujol®, Schering-Plough, São Paulo, Brasil) sem o agente indutor da artrite.

Tratamento

No dia após à indução da artrite por ACF teve início o tratamento fitoterápico, o qual teve duração de 28 dias. A formulação de Ruta toxicodendron foi preparada segundo a farmacotécnica homeopática. Para a obtenção da diluição na potência D9, foi utilizada a razão de 1:10 da tintura mãe (solução hidro alcoólica de estocagem do ativo) em solução hidro alcoólica à base de álcool de cereais, seguida de cem sucções (dinamizações). A solução obtida e demais soluções foram diluídas em solvente hidro alcoólico à base de álcool de cereais na razão 1:10 e succucionadas por 100 vezes até a obtenção da razão final de 1:109 que corresponde a potência D9. A administração da Rhus toxicodendron do grupo A-RT foi realizado por gavagem (2x/dia), sendo a primeira às 8h00m e a segunda às 11h00m da manhã e, o volume administrado em cada uma delas foi de 0,1mL, totalizando 0,2 mL ao dia. Os animais dos grupos C e A receberam 0,2 mL do veículo da formulação (álcool de cereais), seguindo o mesmo padrão de administração dos grupos tratados. Para os animais do grupo A-Ib a dose administrada de ibuprofeno foi de 17,5 mg por quilograma de peso corporal do animal uma vez ao dia (KAUR et al, 2011).

Coleta e processamento do material

Aos 81 dias de idade os animais foram pesados e eutanasiados com tiopental (120 mg/kg) (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA) via intraperitoneal. Os rins foram coletados, lavados, pesados e fixados em formol tamponado 10% por 24 horas. Posteriormente, os rins foram seccionados longitudinalmente e destinados a rotina histológica.

Análises histológicas

Lâminas com secções das amostras de 3µm de espessura foram confeccionadas e destinadas às técnicas histoquímicas de PAS (395B, Sigma-Aldrich) para a análise da densidade glomerular e dos componentes glomerulares, de Tricrômico de Masson (HT15, Sigma-Aldrich) para a análise da fibrose renal e, para a técnica imunohistoquímica de SOD-1 (SC-11407, Tipo: Rabbit polyclonal IgG – Santa Cruz) para a análise do estresse oxidativo tecidual.

Para a realização de todas as análises, foram utilizadas fotomicrografias capturadas no microscópio Nikon Elipse E200-LED com câmera Nikon Digital DXM 1200, no

Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação – LAICI do DMOR-UFRN e software ImageJ (US National Institutes of Health), como descrito a seguir.

Análise da fibrose renal

Foram analisados 20 campos microscópicos por animal em imagens obtidas com objetiva de 40x (área total analisada por rato = 1,0331 mm2). As imagens foram capturadas na região cortical do rim, sendo que em todos os campos pelo menos um glomérulo foi visualizado (SCHNEIDER et al., 2012; YAO et al., 2015; MISE et al., 2017; CROTTY ALEXANDER et al, 2018; SHEN et al., 2019).

Análises imunohistoquímica da Expressão tecidual de SOD-1

Após o processamento e recuperação antigênica, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-SOD-1 (1:100) a temperatura de 4 °C, overnight. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS antes da incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:100; Anti-Rabbit IgG (HRP) – Peroxidase Conjugated, Código: 31466, Pierce® Goat) à temperatura ambiente por 1 hora. A imunorreatividade foi revelada por meio de um sistema de detecção colorimétrico, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, seguido de contracoloração com hematoxilina. A imunorreatividade foi avaliada por meio de um sistema de escores, considerando a extensão de marcação (EM) de células com coloração positiva (variando de <5% a <75%) e a intensidade da marcação (IM) (1, ausente; 2, fraca; 3, moderada; e 4, forte). O escore final foi obtido pela multiplicação da extensão de marcação pela intensidade da marcação (OLIVEIRA et al., 2021; ROMI et al, 2021).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Kruskal-Wallis pelo software GraphPad Prism 11. A avaliação de correlação entre as variáveis foi analisada pelo teste de Sperman. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

Resultados e Discussões

Os resultados foram agrupados em: estresse oxidativo tecidual e fibrose renal.

Estresse oxidativo tecidual e fibrose renal

Os resultados referentes ao estresse oxidativo tecidual, estão representados pela expressão da enzima antioxidante SOD-1 nas amostras renais (Figura 4A), bem como, o percentual de fibras colágenas (%) indicativo de fibrose renal (Figura 4B).

Figura 4. A) Expressão de SOD-1 no tecido renal (escore) dos animais dos grupos C, A, A-Rt e A-Ib (objetiva de 40x, 20 campos/animal) (n=5, teste Kruskal-Wallis, ***p<0,0001). B) Área média ocupada por fibras colágenas dos animais dos grupos C,

A, A-Rt e A-Ib (objetiva de 40x, 100 campos/grupo) (n=5, teste Kruskal-Wallis, *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.) Coloração de Tricrômico de Masson.

A expressão de SOD-1 foi em todos os grupos artríticos em comparação ao grupo controle, sendo que na comparação direta entre os animai artríticos sem tratamento e os saudáveis (grupo C) o aumento da expressão de SOD-1 foi de 242,28% (p<0,0001). Também foram identificadas diferenças nos níveis de SOD-1 tecidual entre os três grupos artríticos sendo que nos tratados houve redução de 32,16% em A-Rt e de 24,98% em A-Ib, quando comparados com o grupo A (p<0,0001).

O percentual da área renal ocupada por fibras colágenas também foi maior nos grupos artríticos em comparação ao controle, sendo que no grupo A houve aumento de 125,81% em relação ao grupo C (p<0,05). Nas comparações entre os grupos artríticos, foi observado aumento de 65,29% em A-Rt (p<0,0001) e de 26,35% em A-Ib (0,001) em comparação ao grupo A. Além disso, no grupo A-Rt o percentual de fibras colágenas foi 30,81% maior que em A-Ib (p<0,0001).

No grupo controle foi observado correlação negativa entre a quantidade de fibras colágenas no rim com os níveis de SOD-1 tecidual (r= -0,080; p<0,0001). Porém, não foram identificadas correlações entre estes parâmetros no grupo A (p>0,05). Os animais do grupo A-Rt apresentaram correlação negativa entre a quantidade de fibras colágenas renais e os níveis de SOD-1 tecidual (r= -0,070; p=0,0006). Semelhantemente ao grupo artrítico sem tratamento, no grupo A-Ib não foram identificadas correlações entre o percentual de colágeno renal com a expressão de SOD-1 nos animais avaliados (p>0,05).

DISCUSSÃO

A fibrose renal é um dos principais determinantes da progressão da doença renal crônica e está diretamente relacionada à persistência de processos inflamatórios e de mecanismos de lesão celular. Embora diferentes etiologias possam apresentar manifestações clínicas distintas, a maioria das doenças fibróticas crônicas compartilha mecanismos caracterizados pela produção persistente de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos, citocinas pró-fibróticas e espécies reativas de oxigênio (EROS). A produção excessiva desses mediadores favorece a deposição progressiva de matriz extracelular, comprometendo a arquitetura renal e contribuindo para a perda da função do órgão. (Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. 2008; 214(2):199-210. Review.)

Nesse contexto, o estresse oxidativo tem sido reconhecido como um importante componente da progressão da fibrose renal. Quando a produção de EROS ultrapassa a capacidade dos sistemas antioxidantes, ocorre um desequilíbrio que favorece danos a diferentes componentes celulares. As EROS podem promover alterações no DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, comprometendo a integridade e a função celular (Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997;82(2):291-5. Review.). Entre os produtos resultantes da peroxidação lipídica, destaca-se o 4-hidroxinonenal ((4-HNE), um aldeído altamente reativo capaz de modificar covalentemente proteínas celulares e de membrana. Dessa forma, o 4-HNE pode atuar tanto como marcador de estresse oxidativo quanto como mediador de alterações associadas à disfunção celular (Mattson et al.)

Entretanto, a superóxido dismutase (SOD) constitui um dos principais mecanismos enzimáticos de defesa contra o excesso de radicais superóxido. A SOD catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, contribuindo para a redução da carga oxidativa celular. Nesse sentido, alterações na expressão da SOD-1 podem refletir uma resposta adaptativa ao aumento da produção de EROS. Uma maior expressão dessa enzima pode representar um mecanismo compensatório destinado a limitar os efeitos do excesso de superóxido. Entretanto, quando a produção de EROS permanece elevada, essa resposta pode não ser suficiente para impedir a ocorrência de dano oxidativo, o que pode ser observado pela presença de produtos de peroxidação lipídica, como o 4-HNE. (Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere CB, et al.) e (Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK.).

Somado a isso, o estresse oxidativo apresenta estreita relação com a inflamação. As EROS podem estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto os mediadores inflamatórios podem, por sua vez, intensificar a geração de espécies reativas. Estabelece-se, portanto, um ciclo de retroalimentação entre inflamação e estresse oxidativo, capaz de manter a lesão celular e favorecer a ativação de vias pró-fibróticas. A persistência desses mecanismos pode estimular a deposição de matriz extracelular e contribuir para a substituição progressiva do tecido renal funcional por tecido fibrótico.

A participação das EROS nesse processo também é observada em diferentes condições associadas à doença renal. O envelhecimento, por exemplo, está relacionado ao aumento da glomeruloesclerose e da fibrose intersticial, acompanhado por alterações celulares como maior acúmulo de mutações no DNA nuclear e mitocondrial, lipofuscina e produtos finais da glicação avançada, além do aumento do estresse oxidativo e da apoptose. Da mesma forma, a lesão renal por isquemia/reperfusão pode provocar produção excessiva de EROS, ultrapassando a capacidade antioxidante do tecido e contribuindo para o dano celular. Esse mecanismo também tem sido relacionado à progressão da nefropatia crônica do aloenxerto após o transplante renal.

Dessa maneira, a associação entre aumento da produção de EROS, alterações nos mecanismos antioxidantes e formação de produtos de peroxidação lipídica reforça a importância do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença renal crônica. A avaliação conjunta de marcadores como 4-HNE e SOD-1 pode, portanto, fornecer informações complementares sobre o equilíbrio entre dano oxidativo e resposta antioxidante. Enquanto o 4-HNE reflete a ocorrência de dano decorrente da peroxidação lipídica, alterações na SOD-1 podem indicar uma tentativa de resposta celular diante do aumento da carga oxidativa. Assim, a interação entre estresse oxidativo, inflamação e ativação de mecanismos pró-fibróticos constitui um processo relevante para compreender a progressão da lesão renal e o desenvolvimento da fibrose.

Diante dessas evidências, o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) destaca-se como um importante indicador de peroxidação lipídica e de dano oxidativo, enquanto a SOD-1 representa um dos principais mecanismos de defesa antioxidante celular. A alteração desses marcadores pode refletir a interação entre o aumento da carga oxidativa e a resposta adaptativa do tecido renal, evidenciando que a capacidade antioxidante pode ser insuficiente diante de uma produção persistente de EROS.

Além disso, a estreita relação entre estresse oxidativo e inflamação contribui para a manutenção de um ambiente favorável à ativação de vias pró-fibróticas e à deposição progressiva de matriz extracelular. Dessa forma, o estresse oxidativo não deve ser considerado um evento isolado, mas parte de um processo multifatorial que envolve inflamação, disfunção mitocondrial, dano celular e remodelamento tecidual.

Desse modo, compreender a participação das EROS e dos mecanismos antioxidantes na doença renal pode contribuir para o melhor entendimento dos processos envolvidos na progressão da fibrose e da doença renal crônica. A avaliação de marcadores como 4-HNE e SOD-1 apresenta potencial para auxiliar na caracterização do desequilíbrio oxidativo e, futuramente, na identificação de estratégias direcionadas à redução do dano oxidativo e à preservação da função renal

Conclusão

Os achados discutidos neste estudo reforçam a participação do estresse oxidativo na progressão da lesão renal e no desenvolvimento da fibrose. O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade dos sistemas antioxidantes pode promover danos ao DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para a perda da integridade celular e para a progressão das alterações estruturais renais, indicando que o tratamento com Rhus toxicodendron não teve efeito protetor nos rins de animais com artrite induzida. Assim, novos estudos são necessários para se estabelecer se a Rhus toxicodendron em outras concentrações ou formas de administração poderiam contribuir reduzindo o estresse oxidativo local ou sistêmico, pois a realizada neste estudo teve efeito nefrotóxico.

Referências

ARORA, S. et al. Evaluation of the cytotoxic effects of CAM therapies: an in vitro study in normal kidney cell lines. The Scientific World Journal, v. 2014,

2014.

AINIWAER P, LI Z, ZANG D, JIANG L, ZOU G, AISA HA. Ruta graveolens: Boost Melanogenic Effects and Protection against Oxidative Damage in

Melanocytes. Antioxidants (Basel)., 2023 Aug 8;12(8):1580. doi: 10.3390/antiox12081580. PMID: 37627575; PMCID: PMC10451875.

ALETAHA, Daniel et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism

collaborative initiative. Arthritis & Rheumatism, v. 62, n. 9, p. 2569-2581, 2010.

BELLAVITE, P. et al. Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,

v. 3, n. 2, p. 171-186, 2006.

CAMPANILE, M., CUOMO, O., BRANCACCIO, P., et al. Ruta graveolens water extract (RGWE) ameliorates ischemic damage and improves neurological

deficits in a rat model of transient focal brain ischemia. Biomedicine & pharmacotherapy, 154, 11358, 2022. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113587.

FRANCO-AGUIRRE, John Querubín; CARDONA-TAPIAS, Alejandro Antonio; CARDONA-ARIAS, Jaiberth Antonio. Calidad de vida relacionada con la

salud en pacientes con artritis reumatoide de Medellín-Colombia, 2014. Revista Colombiana de Reumatología, v. 22, n. 3, p. 153-161, 2015.

HICKSON, LaTonya J. et al. Development of reduced kidney function in rheumatoid arthritis. American Journal of Kidney Diseases, v. 63, n. 2, p. 206-213, 2014.

KAPOOR, Teja; BATHON, Joan. Renal Manifestations of Rheumatoid Arthritis. Rheumatic Disease Clinics, v. 44, n. 4, p. 571-584, 2018.

KARP, J.C. et al. Treatment with Ruta graveolens 5CH and Rhus toxicodendron 9CH may reduce joint pain and stiffness linked to aromatase inhibitors in

women with early breast cancer: results of a pilot observational study. Homeopathy, v. 105, n. 4, p. 299-308, 2016.

LEE, K. J.; YEO, M. G. Homeopathic Rhus toxicodendron has dual effects on the inflammatory response in the mouse preosteoblastic cell line MC3T3- e1.

Homeopathy, v. 105, n. 1, p. 42-47, 2016.

PURIFICAÇÃO, Natan Reyges Castro et al. Combined use of systemic quercetin, glutamine and alpha-tocopherol attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats, Biomedicine & Pharmacotherapy, 151, 113131, 2022.

RODRIGUES, Luís; SILVA, Glória Nunes da; LACERDA, António Pais de. Felty's syndrome–a rare case of febrile neutropenia. Archive of Clinical Cases, v. 6, n. 2, 2019.

SAKA, YOSUKE; TOMOHIKO NARUSE, JUN MATSUMOTO. et al. Low Serum Zinc Concentration Is Associated With Infection Particularly in Patients With Stage 5 Chronic Kidney Disease Medicated with Proton Pump Inhibitors, Journal of Renal Nutrition, 31 (6): 579-585, 2021.

SRIVASTAVA, R. K., TRAYLOR, A. M., MUZAFFAR, S. et al. Chronic kidney disease amplifies severe kidney injury and mortality in a mouse model of skin arsenical exposure. American journal of physiology. Renal physiology, 328(3), F328–F343. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00139.2024, 2025.

PATIL, Chandragouda Raosaheb et al. Dual effect of Toxicodendron pubescens on Carrageenan induced paw edema in rats. Homeopathy, v. 98, n. 2, p. 88-91, 2009.

WU, Q., LI, W., ZHAO, J., SUN, W., et al. Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 137, 111308, 2021.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. 2008; 214(2):199-210. Review.

Djamali A, Reese S, Yracheta J, Oberley T, Hullett D, Becker B. Epithelial-tomesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. Am J Transplant. 2005;5(3):500-9.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 1997;82(2):291-5. Review.

Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. Exp Gerontol. 2009;44(10):625-33. Review.

Baylis C. Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. Exp Gerontol. 2005;40(4):271-8. Review.

Percy CJ, Power D, Gobe GC. Renal ageing: changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. Nephrology (Carlton). 2008;13(2):147-52. Review.

Kim J, Seok YM, Jung KJ, Park KM. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2009;297(2):F461-70.

Anexos



Figura 1

CÓDIGO: SB0622

AUTOR: MARIA EMANUELLY GOMES DE MELO

ORIENTADOR: MARICELE NASCIMENTO BARBOSA

TÍTULO: Avaliação do estresse acadêmico na Resposta Autonômica e nos Níveis de Ansiedade em Estudantes do curso de Biomedicina da UFRN

Resumo

Atualmente o estresse é reconhecido com um dos maiores problemas que acometem a saúde física e mental do indivíduo. Ele corresponde a uma resposta física, psíquica e hormonal que ocorre quando o corpo necessita de adaptação frente a um evento que pode causar desequilíbrio à homeostase do indivíduo. Assim, o ingresso do estudante na Universidade pode mantê-lo em contato com estressores específicos, como as avaliações de conteúdo, a quantidade do material a ser estudado, as demandas impostas no curso, a interferência familiar, a concorrência, entre outros. O objetivo desse estudo foi investigar a resposta cardiovascular e emocional de estudantes do Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Norte durante exposição à dois tipos diferentes de avaliação de conteúdo: prova escrita e gincana. Para isso, foram registrados os valores da pressão arterial sistólica e diastólica, da frequência cardíaca e do estado de ansiedade (IDATE) dos estudantes antes e após as atividades avaliativas (fases basal, pré-teste, pós-teste e recuperação). Foi encontrado um aumento na pressão arterial sistólica na prova escrita e na frequência cardíaca na gincana; o estado de ansiedade variou em ambos os tipos de avaliação. Além disso, foram encontrados os maiores valores nas variáveis cardiovasculares e na resposta emocional dos estudantes nas fases pré teste que antecederam a aplicação do estressor com o retorno aos valores basais após sua finalização. Assim, podemos sugerir que o enfr

Palavras-chave: Estresse; Graduação; Resposta cardiovascular, ansiedade, Estudantes,

TITLE: Assessment of academic stress in the Autonomic Response and Anxiety Levels in Biomedicine Students at UFRN

Abstract

Currently, stress is recognized as one of the biggest problems that affect the physical and mental health of the individual. The Stress corresponds to a physical, psychic and hormonal response that occurs when the body needs to adapt to an event that can cause an imbalance in the individual's homeostasis. Then, the student's admission to the University can keep him in touch with specific stressors, such as content estimates, the

amount of material to be reflected, the demands imposed on the course, family interference, competition, among others. The objective of this study was to investigate the cardiovascular and emotional response of students of the Biomedicine Course at the Federal University of Rio Grande do Norte during exposure to two different types of content evaluation: writing and gymkhana. For this, the values of systolic and diastolic blood pressure, heart rate and state of anxiety (IDATE) of the students were recorded before and after the evaluative activities (baseline, pre-test, post-test and recovery phases). An increase in systolic blood pressure was found in the written test and in heart rate in the gymkhana; the state of anxiety varied in both types of assessment. In addition, the highest values were found in the cardiovascular variables and in the state anxiety of the students in the pre-test phases that preceded the application of the stressor with the return to baseline values after its completion.Thus, we can suggest that coping with stressors can lead

Keywords: Stress; Graduation; Cardiovascular response,Anxiety, Students,

Introdução

Considerado um problema na saúde pública, o estresse afeta, em média, 90% das pessoas em todo o mundo. No Brasil, cerca de 30% da população que está em idade para trabalhar, incluindo aquelas já empregadas ou procurando emprego já foram significativamente afetadas pelo estresse advindo da pressão excessiva (Santos et al., 2017). No transcurso da vida, em determinadas ocasiões, as pressões biopsicossociais são responsáveis por desequilíbrios na homeostase do indivíduo, prejudicando seu desempenho nas mais variadas circunstâncias. Essas pressões geradoras de estresse são vivenciadas em diversas situações, na vida pessoal, social, profissional, e, não menos diferente, durante a trajetória acadêmica (Liu Kam, 2020; Monteiro, 2007). O ingresso na graduação traz inúmeras mudanças em áreas distintas, tanto no âmbito acadêmico, como também pessoal, institucional, vocacional e social (Sahão et al, 2021; Baptista, Ferraz; Inácio, 2020), contribuindo para um aumento do nível de estresse. Neste sentido, alguns estudos têm mostrado que o estresse vem sendo identificado em um nível elevado nos alunos dos cursos da área de saúde por afetar a inteligência emocional, apresentando-se com um papel potencial para os estudantes de medicina, enfermagem e outras áreas da saúde, afetando tanto a saúde mental pessoal quanto a prática profissional (Birks et al, 2009).Neste período, esta população é colocada frente a diversos fatores geradores de estresse, como a mudança dos hábitos, aumento da carga acadêmica, atividades impostas pela universidade, mudança no ambiente e outras situações desconhecidas nunca enfrentadas (Acharya; Jin; Collins, 2018). Além desses fatores, os universitários ainda precisam lidar com a mudança ao surgir a necessidade de sair da casa dos pais para morar com colegas (algumas vezes sendo pessoas desconhecidas), as despesas e dificuldades financeiras para estudar, pressão vinda dos professores ou pais, as preocupações com o futuro, entre outros fatores (Dachew; Bisetegn; Gebremariam, 2015).Embora o estresse seja considerado uma resposta instintiva do corpo humano para lidar com estímulos e eventos que causem algum impacto nas diferentes dimensões e funções no cotidiano, estresse excessivo pode desencadear as mais diversas alterações psicológicas e fisiopatológicas. Dentre muitas alterações físicas desencadeadas pelo estresse estão incluídas doenças gastrointestinais, cardiovasculares, respiratórias, dermatológicas e imunológicas. Diante do estresse prolongado o corpo desempenha uma resposta semelhante como seria frente a uma

situação de perigo, em que há uma elevação da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca e constrição de vasos sanguíneos (Rios OFL, 2006). Esse processo de estresse contínuo pode causar doenças cardiovasculares, variando de doenças crônicas até a crises de aumento de pressão arterial e doenças agudas (William et al, 2002). Além disto, também existem as manifestações psicológicas, como transtornos de ansiedade, insônia, e até mesmo depressão (Lipp, 2013). De acordo com dados de diferentes estudos, lidar com agentes estressores específicos durante a formação profissional são prováveis fatores que contribuem para promoção de diferentes alterações mentais (El-Gilany et al, 2019). A saúde mental dos alunos vem causando uma significada preocupação no ambiente acadêmico, tendo em vista a estimativa de que um em cada cinco universitários no mundo é afetado por um transtorno mental, sendo os transtornos de ansiedade o mais incidente (Souza et al, 2022). O início na vida acadêmica pode deixar o indivíduo cada vez mais ocupado, tendo em vista o aumento das exigências e tarefas. Além disso, esse período pode dar início a vida adulta e levar o estudante a enfrentar novas situações, fazendo com que haja a necessidade de constante adaptação. Dessa forma, as chances de desenvolvimento de depressão e ansiedade aumentam (Cardozo et al., 2016; Carvalho et al., 2015).

Metodologia

Sujeitos: Foram avaliados 30 alunos de ambos os sexos do primeiro período do curso de Biomedicina, com idade entre 18 e 28 anos, sendo 22 alunos do sexo masculino e 8 alunos do sexo feminino. A amostragem foi feita de maneira aleatória, com os indivíduos interessados em participar se disponibilizando voluntariamente. Os indivíduos foram informados que o estudo foi de natureza psicofisiológica, não sendo usada metodologia invasiva para a sua realização, que ocorreu antes e após uma breve entrevista. Em seguida foram apresentados ao planejamento experimental, e aqueles que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) evidenciando estar cientes do caráter voluntário de sua participação, ficando estabelecida a autonomia para adesão e desistência dos participantes em qualquer momento. A seguir, cada voluntário preencheu um Inventário de Identificação que consta de informações gerais, que formaram um banco de dados que serviu para a seleção dos voluntários baseada nos seguintes critérios excludentes: uso de medicamentos (contraceptivos e ansiolíticos), tabagismo, alcoolismo, uso habitual de drogas ilícitas, e história de doenças crônico-degenerativa. Os indivíduos que se enquadraram nos critérios passaram para a etapa seguinte do experimento. Avaliações de conteúdo: O estudante recebeu no início do semestre o cronograma de atividades das disciplinas, no qual estão sinalizados os dias e horários da realização das avaliações. As avaliações de conteúdo fazem parte do calendário de atividades, sendo sua data e hora de seu conhecimento desde o início do período letivo. Dessa forma, avaliações de conteúdo através de teste escrito ou gincana podem ser consideradas estressores crônicos, já que o sujeito tem conhecimento de várias características do estressor, tais como sua natureza, seu tempo de exposição, sua previsibilidade e controle sob sua ocorrência, que pode interferir significativamente em sua resposta fisiológica (Anisman e Merali, 1997). - Escrita: consistiu na resolução de questões subjetivas de conteúdos básicos. Amaioria das questões testou o conhecimento teórico e analítico do estudante; - Gincana: consistiu na identificação de estruturas em peças anatômicas marcadas através de alfinetes coloridos e dispostas em sequência, como também por questões simples que se referem à identificação e localização de porções do corpo

humano. O sujeito permaneceu diante de cada peça ou questão (estação) por 2 minutos respectivamente. -Avaliação do Estado de Ansiedade (IDATE): Antes da aplicação do inventário, os voluntários foram informados que sua identificação foi feita através de suas iniciais e, que os pesquisadores envolvidos no estudo se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para a pesquisa, analisando as informações obtidas em conjunto com as de outros voluntários. Sua identificação individual foi preservada. Ainvestigação da resposta emocional foi feita pela aplicação do seguinte instrumento:Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE).O IDATE, ou Inventário de Ansiedade Traço-Estado é um instrumento de pesquisa psicológica, de autoria de Spielberg et al (1979), versão em português do State-Trait Anxiety Inventory – STAI Y (Spielberger et al, 1970). De acordo com o instrumento, a ansiedade pode ser investigada pelo estado de ansiedade (Aestado): o sujeito indica como se sente em um determinando momento do tempo. O uso do IDATE tem como objetivo medir estados transitórios de ansiedade, que variam em intensidade e flutuam no tempo. De acordo com seus autores (Spielberger et al, 1979), a exposição de indivíduos a situações estressantes normalmente leva a elevação do estado de ansiedade. Ele avalia a variabilidade dos escores das escalas de Ansiedade TraçoEstado pela administração de 1 inventário constituído de 20 afirmações cada. Para cada sensação relatada, o sujeito deve marcar a melhor qualificação para seu estado, numa escala de quatro (4) pontos, de acordo com a intensidade no momento. O resultado é dado pela soma dos valores marcados. - Procedimento Experimental O procedimento experimental foi realizado nos Departamentos de Morfologia (DMOR) e Fisiologia (DFS) do Centro de Biociências da UFRN. No dia marcado, os voluntários foram encaminhados para uma sala na qual foram realizadas 5 etapas descritas abaixo: a) Repouso: o voluntário preencheu o questionário de eventos diários e realizou averiguação das recomendações diárias. A seguir, foram convidados a relaxar, permanecendo em repouso por 10 minutos, ao som de música ambiente; b) Basal: Em cada voluntário foram verificados os valores da frequência cardíaca pela pulsação da artéria radial do membro superior esquerdo, e das pressões arterial sistólica e diastólica, através de um tensiômetro digital. Em seguida foi aplicado o instrumento de avaliação do estado de ansiedade (IDATE). c) Pré-teste: Novamente foram verificados os valores da frequência cardíaca pela pulsação da artéria radial do membro superior esquerdo, das pressões arterial sistólica e diastólica e em seguida o voluntário preencheu o inventário de Ansiedade (IDATE). Esta é considerada uma fase antecipatória, onde provavelmente respostas fisiológicas aos estressores são verificadas (Kirschbaum et al, 1993); d) Teste: realização da avaliação de conteúdo (escrita ou gincana); e) Pós-Teste: o voluntário foi novamente submetido à avaliação cardiovascular (frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica) e emocional (estado de AnsiedadeIDATE); f) Recuperação 1: o voluntário repousou por 20 minutos; g) Recuperação 2: o voluntário foi novamente submetido a avaliação cardiovascular (frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica) e emocional (estado de Ansiedade-IDATE). -Análise Estatística:As variáveis dependentes, as pressões arterial sistólica e diastólica, a frequência cardíaca e o Estado de Ansiedade, foram analisadas através do programa StatSoft STATISTIC

Resultados e Discussões

Os indivíduos analisados durante a aplicação dos estressores mostraram variações quanto à pressão arterial. Durante a realização da avaliação escrita foram verificados os seguintes valores médios de pressão arterial sistólica nas fases basal: 110,67 ± 0,26

mmHg, pré-teste: 117,53 ± 3,06 mmHg, pós-teste: 113,50 ± 3,02 mmHg e recuperação: 110,13 ± 2,09 mmHg. A comparação desses valores através do teste de Friedman ANOVA mostrou uma diferença entre as fases como mostrado. Na aplicação do teste post-hoc de Wilcoxon (Z) para comparar as fases do experimento foi observada uma diferença entre as fases basal e pré-teste, e uma tendência de diferença entre as fases pré-teste e pós-teste com valor de pressão sistólica mais elevado sendo verificado na fase pré-teste. No que se refere aos valores médios da pressão aretrial diastólica na prova escrita obtivemos os seguintes valores: 73,60 ±1,70 mmHg, na fase basal, 76,43 ±1,58 mmHg na fase pré-teste, 76,10 ± 2,03 mmHg na fase pós-teste e 74,27 ± 2,69mmHg fase de recuperação. O teste de Friedman não mostrou diferenças entre as fases (Friedman ANOVA = 2,072; $p \geq 0,05$).Para os valores médios da frequência cardíaca não foi encontrada uma diferença significativa na avaliação escrita entre as fases do experimento. (Friedam ANOVA = 4,496; $p \geq 0,05$). Na fase basal foi de 72,30 ± 2,44 bpm, na pré-teste de 74,13 ± 2,37 bpm, no pós-teste de 73,0 ± 2,74 bpm e na recuperação foi 71,07± 2,61 bpm.Quanto à avaliação do estado de ansiedade realizado através do Inventário IDATE, foram encontrados os seguintes valores: 45,44 para a fase basal, 48,00 para pré-teste, 44,33 para pós-teste e 42,56 para recuperação. Foi verificada uma diferença significativa entre as fases como mostra.Durante a gincana, os valores médios encontrados para a pressão arterial sistólica foram: 115,67 ± 3,11 mmHg na fase basal, 117,00 ± 3,38 mmHg na pré-teste, 117,73 ± 3,42 mmHg na pós-teste e 114,53 ± 3,03 mmHg na recuperação. (Tabela 6) A comparação desses valores através do teste de Friedman ANOVA não mostrou diferença significativa entre as fases (Friedman ANOVA= 5,408; $p \geq 0,05$). Da mesma forma, a pressão arterial diastólica não variou entre as fases do experimento (Friedman ANOVA = 1,0000; $p \geq 0,05$).Com relação à frequência cardíaca registrada durante a gincana foram observados os seguintes valores: 77,80 ± 3,51 bpm na fase basal, 79,60 ± 3,10 bpm na pré-teste, 76,93 ± 3,29 bpm na pós-teste e 73,86 ± 2,64 bpm na recuperação. O teste Friedman ANOVA mostrou uma diferença entre os valores de frequência cardíaca, como pode ser observado na Tabela 6.A aplicação do teste posthoc de Wilcoxon (Z) comparando as fases do experimento mostrou uma diferença entre elas: fase basal x recuperação e fases pré-teste x recuperação (Tabela 7). Os valores da frequência cardíaca foram mais elevados nas fases basal e pré-teste quanto comparado com a fase de recuperação.Com relação ao Inventário IDATE para o estado, os valores médios encontrados durante a gincana foram: 50,67 na fase basal, 50,56 na pré-teste, 38,67 na pós-teste e 38,00 na recuperação. A comparação desses valores pelo Teste de Friedman ANOVA mostrou uma diferença entre as fases como mostra a Tabela 8.Com a análise do teste de Wilcoxon, foram encontradas variações significativas estavam entre as fases: basal x pós-teste, basal x recuperação, pré-teste x pós-teste e pré-teste x recuperação (Tabela 9). Os valores médios de ansiedade foram observados com maior frequência nas fases basal e pré-teste quando comparados com aqueles registrados nas fases pós-teste e recuperação. DICUSSÃO: Os resultados do presente estudo mostraram uma diferença significativa na pressão arterial sistólica na prova escrita entre as fases do experimento, com os maiores valores observados na fase pré-teste. Com relação à frequência cardíaca durante a gincana, os valores médios mais elevados foram verificados nas fases basal e pré-teste quando comparados com a fase de recuperação. A avaliação de estado de ansiedade pelo IDATE mostrou para a prova escrita os níveis mais acentuados na fase pré-teste quando comparado com a recuperação, e na gincana, nas fases basal e pré-teste comparados aos valores nas fases pós-teste e recuperação, respectivamente. Diante dos resultados obtidos, fica evidente que na fase pré-teste, tanto na avaliação por meio de prova escrita quanto na gincana, observou-se, dentre as etapas do experimento, os

maiores valores das respostas fisiológicas analisadas. Considerando que esta é descrita como a fase de resposta antecipatória, por se tratar daquele estado em que o organismo desenvolve uma resposta frente a um estímulo, sendo, neste caso, o agente estressor específico, é esperado que as variáveis cardiovasculares sejam alteradas, tendo em vista que o sistema cardiovascular é um participante ativo da resposta ao estresse, sendo influenciado pelos sistemas regulatórios neural e humoral. Assim, os principais resultados das respostas cardiovasculares são o aumento da frequência cardíaca, do débito cardíaco e da pressão arterial (Loures et al, 2002). Nesse sentido, McGraw et al. (2012) avaliou a resposta autonômica (frequência cardíaca e pressão arterial) e hormonal (cortisol salivar) de 38 enfermeiras do exército em 3 situações: antes, durante e após a simulação de situação de combate. Foram verificados aumento nos níveis de cortisol salivar, na pressão arterial e na frequência cardíaca durante a realização da simulação comparados a aqueles observados na fase de recuperação (30 minutos após o término da simulação de guerra). Sugere-se que a apresentação de situações estressantes agudas e crônicas mobiliza o indivíduo internamente com o objetivo de ajustar sua resposta fisiológica as demandas apresentadas por seu meio externo e interno. Comparando os resultados obtidos na aferição da Pressão arterial sistólica e diastólica na fase basal com os valores da fase de recuperação não foram encontrados valores significativos, ou uma elevação preocupante nos estudantes frente ao fator causador de estresse. Semelhantemente, um estudo recente encontrou os seguintes valores da PAsistólica e diastólica inicial e final comparando dois grupos: um com sintomas de estresse, e o outro grupo considerado como assintomático. Nesta pesquisa, não foram encontradas maiores alterações dessas variáveis cardiovasculares nos participantes sintomáticos, apesar de que o esperado é que pessoas portadoras de sintomas de estresse apresentem sinais de hipertensão, como resultado da liberação de hormônio devido a vasoconstricção que ocorre nessa condição (Oliveira; Santos, 2019). Com relação à frequência cardíaca, não foi verificada uma importante variação dos valores durante a prova escrita, sugerindo que possivelmente esse não é um estressor significativo que cause algum impacto nos valores dessa variável, se comparado a outras formas de avaliação de conteúdo como a apresentação oral e a avaliação de competência clínica propostas por Sarid et al. (2005), como observado neste estudo com relação às avaliações de conteúdo de caráter prático por meio da realização das gincanas. Os maiores valores da frequência cardíaca durante o estudo foram encontrados na fase basal e pré-teste em relação a gincana, antes mesmo do indivíduo ser exposto aos agentes estressores específicos. Sugere-se que essa variação ocorreu devido o conhecimento prévio que o discente possui sobre a natureza do teste, o que implica no desenvolvimento de uma resposta quase imediata e adaptativa frente a uma situação vista como um perigo pelo organismo. Essa resposta pode ser caracterizada por um traço do esforço de adaptação que nosso organismo elabora nessas situações (Loures et al, 2002). De acordo com o exposto na literatura, dentre os agentes estressores específicos estão às pressões com o tempo de avaliação, à competição por um bom desempenho, o caráter da avaliação e à carga horária (Toews et al, 1997; Ribeiro et al, 2018). Em relação ao estado de ansiedade IDATE, os indivíduos apresentaram um maior estado de ansiedade nas fases que antecederam a prova escrita e a gincana. Especificamente, a avaliação de conteúdo realizado por meio da gincana é uma situação que gera ansiedade no indivíduo, sendo assim o contato com uma avaliação desse caráter demonstra que a maioria dos estudantes se sentem ansiosos ainda durante a fase basal, por já terem conhecimento do seu funcionamento e duração, por exemplo. Sugere-se que a variação no nível de ansiedade verificado nos indivíduos nas fases antecipatórias do teste pode ter sofrido influência de fatores como o medo de não

conseguir recordar o assunto estudado, ou até mesmo a pressão para ser aprovado. Ambas as situações fazem com que seja necessário a modulação de uma resposta e uma adaptação psicofisiológica para que o indivíduo se prepare e saiba lidar com tal situação. É importante mencionar que, a ansiedade verificada no período que antecede as avaliações (Bzuneck & Silva, 1989; Rosário & Soares, 2003), afeta o desempenho dos estudantes nos exames em função de seu componente cognitivo podendo interferir no nível de atenção e concentração. Assim, a resposta de estresse sinalizada pelo estado de ansiedade registrado no presente estudo, pode auxiliar na elaboração de mudanças na formação educacional dos estudantes através da avaliação do efeito das avaliações no estado físico e emocional desses indivíduos e, suas possíveis repercussões no desempenho acadêmico.

Conclusão

Em síntese, os valores médios da pressão arterial (sistólica), frequência cardíaca e pontuações no Inventário de Ansiedade pelo IDATE foram maiores nas fases que antecederam a aplicação dos estressores, por se tratar da fase em que ocorre a resposta antecipatória. Além disso, foi possível analisar que após a finalização da exposição dos estressores, os valores médios das variáveis fisiológicas voltaram para os níveis basais. Logo, essas respostas estão provavelmente associadas aos ajustes fisiológicos necessários para o enfrentamento de situações estressantes. Entretanto, não foi obtido nenhuma alteração significante das variáveis analisadas, ou do estado de ansiedade, que possam indicar que a apresentação desses agentes estressores cause algum impacto nas funções cardiovasculares normais dos indivíduos.

Referências

Acharya L, Jin L, Collins W. College life is stressful today - Emerging stressors and depressive symptoms in college students. J Am Coll Health. 2018 Oct;66(7):655-664. doi: 10.1080/07448481.2018.1451869. Epub 2018 May 22. PMID: 29565759. Allen HK, Barrall AL, Vincent KB, Arria AM. Stress and Burnout Among Graduate Students: Moderation by Sleep Duration and Quality. Int J Behav Med. 2021 Feb;28(1):21-28. doi: 10.1007/s12529-020-09867-8. PMID: 32124246; PMCID: PMC7483179. Anisman H, Merali Z. Chronic stressors and depression: distinguishing characteristics and individual profiles. Psychopharmacology (Berl). 1997 Dec;134(4):330-2; discussion 371-7. doi: 10.1007/s002130050457. PMID: 9452164. BALLONE, G. J. -Síndrome de Burnout - in. PsiqWeb, Internet, disponível em www.psiqweb.med.br, revisto em 2005. Baptista, M. N., Ferraz A. S., Inácio, A. L. M. Adaptação Acadêmica e Saúde Mental no Ensino Superior. In A. B. Soares, L. Mourão, & M. C. Monteiro (Orgs.), O estudante universitário brasileiro: Saúde mental, escolha profissional, adaptação à universidade e desenvolvimento de carreira. 2020, Curitiba, PR: Appris. Birks, Y., McKendree, J. & Watt, I. Inteligência emocional e estresse percebido em estudantes de saúde: uma pesquisa multi-institucional e multi-profissional. BMC Med Educ 9, 61 (2009). Bzuneck, J. A. e Silva, R.. O problema da ansiedade nas provas; perspectivas contemporâneas. Semina,10, 190-195, 1989. Cardozo, Mayara. Fatores Associados à Ocorrência de Ansiedade dos Acadêmicos de Biomedicina. Saúde e Pesquisa, 9(2), 251-262, 2013. Disponível em: https://doi: 10.177651/1983-1870.2016v9n2p251-262.

Dachew, Berihun; Bisetgn, Telake; Gebremariam, Resom. Prevalence of mental distress and associated factors among undergraduate students of University of Gondar, Northwest Ethiopia: a cross-sectional institutional based study. PLoS One. 2015 Mar 20;10(3):e0119464. doi: 10.1371/journal.pone.0119464. PMID: 25794278; PMCID: PMC4368633. El-Gilany AH, Amro M, Eladawi N, Khalil M. Estado de saúde mental de estudantes de medicina: um único estudo do corpo docente no Egito. J Nerv Ment Dis. 2019;207(5):348–54. Furtado O, Eliane de Sousa; Falcone, Eliane Mary de Oliveira; Clark, Cynthia. Avaliação do estresse e das habilidades sociais na experiência acadêmica de estudantes de medicina de uma universidade do Rio de Janeiro. Interação em Psicologia, Curitiba, 2003. ISSN 1981-8076. Disponível em: https://revistas.ufpr.br/psicologia/article/view/3222. KAM, S. X. L et al. Estresse em estudantes ao longo da graduação médica. Revista Brasileira de Educação Médica, v. 43, n. 1, p. 246-253, 2019. Kirschbaum C, Pirke KM, Hellhammer DH. The 'Trier Social Stress Test'-a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. Neuropsychobiology. 1993;28(1-2):76-81. doi: 10.1159/000119004. PMID: 8255414. LEÃO, A. M. et al. Prevalência e Fatores Associados à Depressão e Ansiedade entre Estudantes Universitários da Área da Saúde de um Grande Centro Urbano do Nordeste do Brasil. Revista Brasileira de Educação Médica, v. 42, n. 4, p. 55-65, 2018. Lipp, M. E. N. (2013). Relação entre Stress e Depressão. IPCS - Instituto de Psicologia e Controle de Stress [Website]. Disponível em> de http://www.estresse.com.br/publicacoes/relacao-entre-stress-e-depressao/ Loures, Débora et al. Estresse Mental e Sistema Cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 78, n. 5, p. 525-530, maio 2002. McGraw, l.k; Out, D; Hammermeister, J.J; Ohlson, C.J; Pickering, M.A; Granger, D.A. Nature, correlates, and consequences of stress-related biological reactivity and regulation in Army nurses during combt casualty simulation. Psuchoneuroendocrinology. v.38, p.135-144, 2012. Monteiro CF, Freitas JF, Ribeiro AA. Estresse no cotidiano acadêmico: o olhar dos alunos de enfermagem da Universidade Federal do Piauí. Escola Anna Nery Revista de Enfermagem. 2007;11(1): 66-72. Oliveira, Daniele; Santos, Sabrina. Relação entre o estresse e as variáveis cardiovasculares de alunos do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade de Brasília. 2019. 41 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Fisioterapia), Universidade de Brasília, Brasília, 2019. Oliveira J.C.B, Carvalho L.C, Almeida, J.C.V, e Figueredo P.M.C. O estresse dos estudantes universitários de enefermagem de uma instituição privada do Rio de Janeiro. Revista Presença, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 39-55, sep. 2015. ISSN 2447-1534. Pafaro, R.C; Martino, M.M.F. Estudo do Estresse do Enfermeiro com Dupla Jornada de Trabalho em um Hospital de Oncologia Pediátrica de Campinas. Revista da Escola de Enfermagem. São Paulo, v. 38, n.2, p. 152-160, 2004. Ribeiro RP, MHP Marziale, JT Martins, MJQ Galdino, PHV Ribeiro. Estresse ocupacional entre trabalhadores de saúde de um hospital universitário Rev. Gaúcha Enfermagem. Porto, 2018. Rios OFL. The stress index with the depression intensity in college students. Dissertação (Mestrado em Psicologia) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2006. Rosario, P; Soares, S. Ansiedade face aos testes e realização escolar no Ensino Básico.

CÓDIGO: SB0630

AUTOR: ANA PAULA GARCIA DELGADO

ORIENTADOR: KATIA CASTANHO SCORTECCI

TÍTULO: Efeito do estresse salino com 50 mM de NaCl combinado com microgravidade simulada em plantas de Lemna aequinoctialis

Resumo

A busca por plantas adaptáveis a estresses abióticos, como a salinização, e a investigação dos efeitos da alteração gravitacional têm se intensificado. A lentilha-d'água (*Lemna aequinoctialis*) destaca-se pelo rápido crescimento, adaptabilidade e potencial biotecnológico, mas a interação entre estresse salino e microgravidade ainda é pouco explorada na espécie. Neste trabalho avaliou-se os efeitos do estresse salino (50 mM) e da microgravidade simulada (15 rpm por 2h em clinostato 2D) em *L. aequinoctialis*, dividida em quatro grupos (C, T1, T2 e T3) e coletada nos dias 0, 5 e 10 pós-tratamento. Foram feitas análises morfológicas (massa fresca, crescimento e coloração) e bioquímicas (compostos fenólicos, DPPH, quelação de cobre, poder redutor e teor proteico total). Os resultados indicaram amarelamento e branqueamento nos grupos T1 e T3, enquanto o T2 apresentou coloração mais intensa. Quanto à capacidade antioxidante, o grupo T3 teve maior concentração de compostos fenólicos e capacidade redutora nos dias 0 e 5 em relação aos demais grupos. Na quelação de cobre, apenas o grupo T2 apresentou atividade. Os resultados evidenciam parte do comportamento da lentilha-d'água sob estresse salino e microgravidade isolados e combinados, reforçando seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Lemna aequinoctialis. Microgravidade. Estresse salino. Antioxidante.

TITLE: Effect of saline stress with 50 mM NaCl combined with simulated microgravity on Lemna aequinoctialis plants

Abstract

The search for plants adaptable to abiotic stresses, such as salinization, and the investigation into the effects of altered gravity have intensified. Duckweed (*Lemna aequinoctialis*) stands out due to its rapid growth, adaptability, and biotechnological potential; however, the interaction between salt stress and microgravity remains largely unexplored in this species. This study evaluated the effects of salt stress (50 mM) and simulated microgravity (15 rpm for 2 h using a 2D clinostat) on *L. aequinoctialis*, which was divided into four groups (C, T1, T2, and T3) and collected on days 0, 5, and 10 post-treatment. Morphological analyses (fresh weight, growth, and coloration) and biochemical assays (quantification of phenolic compounds, DPPH radical scavenging activity, copper-chelating capacity, reducing power, and total protein content) were performed. The results showed chlorosis and bleaching in groups T1 and T3, whereas T2 exhibited a more intense coloration. Regarding antioxidant capacity, group T3 displayed higher phenolic compound concentrations and reducing power on days 0 and 5 compared to the other groups. For copper-chelating capacity, only group T2 exhibited activity. These results highlight the response of duckweed under individual and combined salt stress and microgravity conditions, reinforcing its biotechnological potential.

Keywords: Lemna aequinoctialis. Microgravity. Saline stress. Antioxidant.

Introdução

A falta de manejo adequado dos recursos naturais ocasionam a degradação do meio ambiente, como é o caso da salinização de águas subterrâneas e superficiais e desertificação do solo, que ocorrem principalmente por atividades antropogênicas, como por exemplo a agricultura, que ao utilizar esses recursos de maneira inadequada causa o acúmulo de sais solúveis nestes meios (Rengasamy, 2006). O excesso de sais é considerado um estresse abiótico, no qual inicialmente inibe o crescimento da planta, induz a produção de ácido abscísico que leva ao fechamento estomático, reduzindo a fotossíntese e a ocorrência do estresse oxidativo e desequilíbrio osmótico celular (Zhu, 2007). Com isso, além do uso de culturas de cana-de-açúcar, pomares e coco como alternativas mais resistentes ao meio salino, a procura de novas culturas que sejam mais tolerantes à esse ainda é de grande importância para contornar essa problemática (Tarolli et al., 2024).

De acordo com Lopez et al (2014) a gravidade também é outro fator ambiental importante para o desenvolvimento vegetal, o qual orienta o crescimento e desenvolvimento da planta, e quando ocorre uma mudança na gravidade, seja na sua força ou direção, a planta tem a capacidade de reorientação, devido ao seu gravitropismo. Desse modo, o uso de métodos que alterem a gravidade, como os clinostatos, máquinas de posicionamento aleatório (*Random Positioning Machine* - RPM) e dispositivos de levitação magnética, se tornaram alvo de estudos para compreender que tipo de mudanças, sejam elas morfológicas, fisiológicas ou metabólicas, esse tipo de alteração pode ocasionar e consequente o seu uso para o benefício humano (Arantes; Lopes; Fávero, 2025).

Visto esses cenários, *Lemna aequinoctialis*, monocotiledônea aquática conhecida como lentilha-d'água ou "duckweeds", é reconhecida por apresentar rápida taxa de crescimento, tamanho reduzido, grande capacidade de acúmulo de amido, absorção de nutrientes e

síntese de proteínas (Escobar & Escobar, 2017). Devido a sua alta adaptabilidade ao ambiente aquático, sendo uma planta tolerante a níveis altos de contaminantes, é utilizada para recuperação de corpos d'água por meio da técnica de fitorremediação (Cai, 2022).

Embora já existam estudos que analisem separadamente o estresse salino e a indução da microgravidade simulada em diferentes espécies, entender como a *L. aequinoctialis* responde a esses estresses em conjunto ainda é de grande importância para a compreensão de seu potencial alimentício e biotecnológico. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos do estresse salino e da indução da microgravidade separadamente e em conjunto.

Metodologia

Obtenção e cultivo das plantas para o experimento
Plantas de *Lemna aequinoctialis* cedidas pelo Dr. Tercilio Calsa Júnior (UFPE) foram multiplicadas no Laboratório de Transformação de Plantas e Análise em Microscopia (LTPAM). O cultivo ocorreu em frascos esterilizados com 25 mL de meio 0,5x SH (Schenk and Hildebrandt Basal Salt Mixture, PhytoTech Labs) adicionado de 1% de sacarose (10 $g \cdot L^{-1}$), solução de vitaminas (tiamina e piridoxina, 1 $mL \cdot L^{-1}$), Clavulin (4 $mL \cdot L^{-1}$) e Meropenem (1 $mL \cdot L^{-1}$). O material foi mantido em sala de crescimento a 23 °C com fotoperíodo de 12h luz/12h escuro e renovação do meio a cada 7 dias. Para o experimento, as lemnas foram separadas em quatro grupos na qual todos foram submetidos à 5 dias de crescimento: (1) Controle, caracterizado por não haver estresse salino e a indução da microgravidade simulada; (2) T1, presença somente do estresse salino; (2) T2, presença somente da microgravidade simulada; e (3) T3, caracterizado por haver ambos estresses, salino e indução da microgravidade. Para as plantas T1 e T3, é adicionado ao meio de cultura utilizado a solução NaCl 5M (10 mL.L-1), enquanto para o Controle e T2, não há a adição desta solução.
Indução da microgravidade simulada
A microgravidade simulada foi induzida em clinostato 2D. As plantas foram transferidas aleatoriamente para tubos cônicos de 15 mL contendo 10 mL de meio SH 0,5x (com ou sem NaCl, conforme o tratamento) e submetidas a rotação de 15 rpm por 2 horas. Após essa etapa, as plantas dos quatro grupos (incluindo Controle e T1) foram avaliadas em três tempos de crescimento pós-tratamento: 0, 5 e 10 dias.
Análise morfológica
Para a análise morfológica, foram avaliadas a coloração, massa fresca e quantidade das plantas. Para isso foi escolhido um pote de cultura do tratamento de forma randômica e foram retiradas 5 plantas aleatoriamente para serem feitas as análises.
Contagem
Todas as plantas de um pote de cultura foram distribuídas uniformemente em uma placa de petri de 14 cm de diâmetro, no qual foi dividida em 8 quadrantes do mesmo tamanho. Após isso, foram sorteados dois quadrantes e é feita a contagem dos conjuntos de frondes e frondes "solitários" presentes dos mesmos. O valor dos dois quadrantes foram somados e logo divididos por 2 (equivalente a média de plantas por quadrante), multiplica-se o resultado por 8 (quantidade de quadrantes presentes na placa), representando um valor aproximado de plantas presentes em um pote de cultura.
Na seguinte equação, q1 é equivalente ao quadrante 1 e q2 é equivalente ao quadrante 2:
$(q1/2 + q2/2) * 8 \cong$ valor total de plantas

Obtenção dos extratos aquosos

As plantas foram coletadas, mantidas em envelopes de alumínio a -20 °C e trituradas em almofariz. Adicionou-se água destilada (1 g de planta para 100 mL, proporção de 10 mg/mL). A mistura passou por maceração em mesa agitadora a 124 rpm por 24h a abrigo da luz, seguida de filtragem em papel filtro qualitativo e secagem em fluxo laminar a 22 °C. O resíduo seco foi raspado, pesado, ressuspenso em água destilada até a concentração final de 10 mg/mL e armazenado a -20 °C.

Testes bioquímicos

Compostos fenólicos

Para a quantificação de fenólicos totais, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteau, usando concentrações de ácido gálico para a criação da curva padrão (Wong-paz et al., 2014). Em triplicata, foram pipetados 10 µL de extrato (proporção de 10 mg/mL), 10 µL de água destilada, 20 µL do reagente Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA), 20 µL de carbonato de sódio (concentração de 1 g/mL) e por fim 125 µL de água destilada, para o branco foi utilizado 20 µL de água destilada em substituição ao extrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Biotek Epoch Microplate - California, USA), no Laboratório de Biopolímeros da UFRN (coord. Prof. Dr. Hugo Rocha), a 790 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg ag./mg).

Teor proteico total

Para a quantificação do teor de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976) com curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). Em triplicata, pipetou-se 10 µL de extrato (10 mg/mL) e 200 µL de reagente de Bradford. Após 15 min de agitação, mediu-se a absorbância a 595 nm. Resultados expressos em mg de albumina por mg de amostra.

Sequestro do Radical DPPH

Amostras a 100 µg/mL foram misturadas a água destilada e solução etanólica de DPPH (150 µM), com controle apenas de DPPH. Após 30 min de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, realizou-se a leitura a 517 nm. Percentual de sequestro calculado conforme Kumar Yadav et al. (2024): % = [(Controle - (Amostra - Branco da amostra) / Controle] × 100

Quelação de cobre

Misturou-se 100 µg de amostra com tampão acetato (50 mM, pH 6), violeta de pirocatecol (4 mM) e sulfato de cobre pentahidratado (0,05 mg/mL). Absorbância lida a 632 nm e calculada por: Quelação de cobre (%) = [1 - (A.amostra/A.branco)] x 100

Poder Redutor

Método de Wang et al. (2008) com curva de calibração de ácido ascórbico. Amostras a 100 µg/mL foram incubadas em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) com ferricianeto de potássio 1% a 50 °C por 20 min. A reação foi interrompida com ácido tricloroacético 10%, seguida de adição de água destilada e cloreto férrico 0,1%. Absorbância lida a 700 nm. Resultados expressos em percentual equivalente a 0,1 mg/mL de ácido ascórbico.

Análise Estatística

Análises realizadas no software GraphPad Prism (v. 8.0.1) via ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando

Resultados e Discussões

Morfologia

Considerando que a microgravidade e o estresse salino podem ter a capacidade de desenvolver mudanças morfológicas nas plantas, foi analisado o crescimento, peso e coloração das plantas expostas tanto a nenhum estresse (C), quanto a somente um tipo de estresse (T1 - estresse salino ou T2 - indução a microgravidade) e em conjunto (T3). Como observado na figura 1, houve alteração na coloração das frondes em plantas T1, com o amarelamento e a perda total da clorofila a partir do dia 5 após os dias iniciais de crescimento, em T2 foi observado uma coloração mais intensa do verde da fronde no décimo dia, e em plantas T3 o amarelamento e branqueamento/esbranquiçamento é percebido de forma mais intensa no décimo dia após os dias iniciais de crescimento.

Quanto ao parâmetro crescimento, foi analisada a quantidade de indivíduos por pote, contabilizando fronde-mãe e fronde-filha, quando ainda não destacada, como um único indivíduo. O grupo T1 apresentaram valores menores em relação aos outros grupos, e plantas T3, após o quinto dia apresentaram valores maiores de crescimento no décimo dia, no entanto, estatisticamente não houve diferença significativa (figura 2a).

Analisando a massa de cada grupo foi observado diferença significativa nos tratamentos coletados no dia 0, 5 e 10 (figura 2b). No dia zero, estatisticamente houve separação em dois grupos, o controle, com média de 1,41 mg, e a junção de T1 (0,70 mg), T2 (0,45 mg) e T3 (0,73 mg) por apresentarem mesma significância, em que foi observado em T1 e T3 uma redução de 50% na massa fresca em comparação com o controle, e em T2 houve redução de aproximadamente 70% do controle. No dia 5, houve a separação em quatro grupos: o controle (2,24 mg); T2 (1,69 mg) com menor significância por apresentar uma redução massa de 24,6% em relação ao controle; T3 (1,51 mg) com diminuição de 36,6% em relação a C; e T1 (1,37 mg) com a maior diferença estatística, sendo observado uma redução de aproximadamente 39%. No dia 10, houve separação em três grupos, C (2.82 mg) e T3 (2,66 mg) não apresentando diferença significativa entre eles, T2 (3,37 mg) com acréscimo de 20% de massa fresca em relação a C, e T1 (1,81 mg) que apresenta a menor média de massa em comparação com os outros grupo.

Feita a análise desses parâmetros, foi optado investigar a correlação entre eles em grama por indivíduo, mas não houve diferença significativa entre os grupos e seus controles (figura 2c).

Capacidade antioxidante

Para avaliar a capacidade antioxidante da *L. aequinoctialis*, foram realizados quatro testes bioquímicos: fenólicos totais, DPPH, quelação de cobre e poder redutor. No teste para avaliar os compostos fenólicos totais foi possível observar que o grupo T3 obteve médias significativamente maiores no dia 0 e 5 em comparação com o grupo controle, com um aumento de aproximadamente 1,7 × e 9 ×, respectivamente, entretanto, no décimo dia houve uma redução desses compostos quando comparado com os dias anteriores. No dia 0, apesar desse alto valor de T3, os outros grupos obtiveram a mesma significância. No dia 5, ocorreu a separação em três grupos: C com média de 1,57; T1 (4,14) e T2 (4,19); e T3, como já citado, apresentando o maior valor (13,80). No dia 10, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos, sendo considerados como um mesmo grupo.

Quanto à capacidade de sequestro do radical orgânico DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) foi observado a presença de diferença significativa somente no dia 0 pelo grupo T1, que quando comparado ao grupo controle, teve uma redução de 8%.

No teste de quelação de cobre, foi avaliada a capacidade de quelação da amostra por meio da competição entre os compostos presentes nas amostras de cada grupo e o violeta de pirocatecol para formar complexos com os íons cobre. Desse modo, foi observado maior atividade do grupo T2 em relação aos outros grupos, sendo seu ápice de atividade no dia 5 com 44,94% quelação, e redução de aproximadamente 18% no dia 10.

Quanto a capacidade redutora, foi observado que os extratos relacionados aos tratamentos nos quais não passavam pelo estresse salino (C e T2) apresentaram um aumento gradual na capacidade redutora, entretanto, grupos como o T1 e o T3, que passaram pelo estresse salino, apresentaram o comportamento contrário. No dia 0, estatisticamente, o T1 e T3 apresentaram valores significativamente maiores que o controle, de 10 × e 12 ×, respectivamente. No dia 5, o único grupo diferente estatisticamente é o T3, sendo 2,6 × maior que C. Por fim, no dia 10, os grupos T1, T2 e T3 apresentaram valores menores que C, em que, estatisticamente, T1 e T3 têm maior significância em comparação a T2, o qual é aproximadamente 50% menor que C.

Quantificação do teor protéico

Para avaliar a quantificação de proteínas de cada extrato foi utilizado o método de Bradford. Desse modo, foi observado que no dia 0, quando em comparação a C, T1 não apresentou diferença significativa, já T2 teve um aumento de 48%, enquanto T3 teve uma redução de 80,5%. No dia 5, os valores de T2 e T3 se assemelham estatisticamente, sendo aproximadamente 63% menores em comparação a C e T1. Em contrapartida, no dia 10 foi observado que não houve diferença estatística entre os grupos, apresentando valores entre 4 e 7 mg de albumina/mg.

DISCUSSÃO

Como visto em trabalhos anteriores, a exposição da lentilha-d'água ao estresse salino leva a clorose e branqueamento das frondes (Chang et al., 2012; Marciana, 2017), circunstância que foi observada neste trabalho nas plantas T1 e T3, podendo indicar danificação do sistema fotossintético. Mas ainda é necessário neste trabalho novos experimentos para compreender essa relação.

Foi observado também o aumento de compostos fenólicos e capacidade redutora em T3 nos dias 0 e 5. Vale ressaltar que, o aumento desses fenólicos e a capacidade redutora estão relacionados com o estresse oxidativo, causado pelo estresse salino, no qual induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas reativas que em baixos níveis funcionam como moléculas sinalizadoras mas em níveis mais elevados podem causar danos celulares (Nakajima et al.,2019; Fu & Yang, 2023).

Levando em consideração que a *L. aequinoctialis* vem sendo estudada pela sua aplicabilidade na alimentação, principalmente como ração para peixes (Oláh; Appenroth; Sree, 2023), foi analisado o efeito dos estresses em sua individualidade e também usados em conjunto, para analisar o acúmulo de proteínas. Nos dias 0 e 5, quando são expostas a somente um tipo de estresse (T1 e T3), apresentam uma maior quantidade de proteínas do que quando expostas a elas em conjunto, porém, ainda é de grande importância investigar outros aspectos que influenciariam em seu uso como alimento ou ração, como por exemplo sua toxicidade

Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o estresse salino pode induzir a uma alteração na coloração das frondes da *Lemna aequinoctialis*, redução na massa fresca e melhorar a capacidade redutora dessa planta. Quando exposta somente à mudança de gravidade, influenciou positivamente na massa fresca e capacidade de quelação de cobre. Ao unir esses estresse houve aumento nos metabólitos secundários e também na capacidade redutora. Por fim, para compreender melhor os mecanismos tomados por essa planta para contornar tais situações de estresse ainda é necessário fazer mais análises, como a quantificação de ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e outras atividades fisiológicas, como também avaliar a variação morfológica causada por esses estresses, mensurando comprimento das raízes e área das frondes.

Referências

ARANTES, José Henrique Barrili; LOPES, Maurício Antônio; FÁVERO, Alessandra Pereira. Microgravity and ionizing radiation on plant development in space. Ciência e Agrotecnologia, v. 49, p. e012025, 2025.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 29 jan. 1976.

CAI, Xiao-Yu et al. Removal of dinotefuran, thiacloprid, and imidaclothiz neonicotinoids in water using a novel Pseudomonas monteilii FC02–duckweed (Lemna aequinoctialis) partnership. Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 906026, 2022.

DE MORAIS, Marciana Bizerra et al. Salt stress induces increase in starch accumulation in duckweed (Lemna aequinoctialis, Lemnaceae): Biochemical and physiological aspects. Journal of Plant Growth Regulation, v. 38, n. 2, p. 683-700, 2019.

ESCOBAR, Christine; ESCOBAR, Adam. Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for bioregenerative life support systems, 2017.

FU, Honging; YANG, Yong. How Plants Tolerate Salt Stress. Current Issues in Molecular Biology, v. 45, n. 7, p. 5914-5934, 15 jul. 2023.

LOPEZ, Delphine et al. Gravity sensing, a largely misunderstood trigger of plant orientated growth. Frontiers in Plant Science, v. 5, p. 610, 5 nov. 2014.

NAKAJIMA, S. et al. Enhanced Antioxidant Activity in Mung Bean Seedlings Grown under Slow Clinorotation. Microgravity Science and Technology, v. 31, n. 4, p. 395–401, 2019.

OLÁH, Viktor; APPENROTH, Klaus-Juergen; SREE, K. Sowjanya. Duckweed: research meets applications. Plants, v. 12, n. 18, p. 3307, 2023.

RENGASAMY, Pitchu. World salinization with emphasis on Australia. Journal of Experimental Botany, v. 57, n. 5, p. 1017-1023, 2006.

SHETE, Pratik. Biotechnological Application in Animal Nutrition and Feed Technology: Mini Review. Acta Scientific Veterinary Sciences, v. 5, n. 5, p. 67-70, 2023.

TAROLLI, Paolo et al. Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strategies combining nature-based solutions and bioengineering. iScience, v. 27, n. 2, p. 108830, 12 jan. 2024.

WANG, Jing et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from Laminaria japonica. International Journal of Biological Macromolecules, v. 42, n. 2, p. 127-132, 1 mar. 2008.

WONG-PAZ, Jorge E. et al. Microplate quantification of total phenolic content from plant extracts obtained by conventional and ultrasound methods. Phytochemical Analysis, v. 25, n. 5, p. 439-444, 2014.

YADAV, Nitesh K. et al. Characterization of Bioactive Metabolites and Antioxidant Activities in Solid and Liquid Fractions of Fresh Duckweed (Wolffia globosa) Subjected to Different Cell Wall Rupture Methods. ACS Omega, v. 9, n. 18, p. 19940–19955, 7 maio 2024.

ZHU, Jian-Kang. Plant salt stress. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Chichester: Wiley, 2007. p. 1–3.

Anexos



Crescimento da planta L. aequinoctialis exposta à diferentes estresses e dias



Dados morfológicos analisados



Atividade antioxidante do extrato aquoso da planta Lemna aequinoctialis.



Teor de proteínas totais do extrato aquoso da planta Lemna aequinoctialis.

CÓDIGO: SB0644

AUTOR: DANIELLE BORGES BENTO DE OLIVEIRA

COAUTOR: LUIZA GIOVANA PAULINO TINOCO

COAUTOR: THIAGO GONZALES SAMARITANO VILLALPANDO SILVA

COAUTOR: JECYMARA REGO DA SILVA TINOCO PEREIRA

ORIENTADOR: VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO

TÍTULO: Toxoplasmose experimental: Perfil inflamatório e papel de cepas clonais e atípicas de Toxoplasma gondii na patogênese

Resumo

A toxoplasmose congênita e a infecção vertical pelo vírus Zika (ZIKV) são causas reconhecidas de dano neurológico fetal. A coinfecção durante a gestação pode modular a resposta imune materno-fetal, porém ainda não existem modelos experimentais que reproduzam essa interação. Este estudo teve como objetivo estabelecer e padronizar um modelo murino de coinfecção congênita pela cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* e ZIKV. Fêmeas BALB/c dos grupos de monoinfecção por *T. gondii* e coinfecção foram inoculadas por via oral com 15 cistos teciduais da cepa ME-49. Após 20 dias, iniciou-se o acasalamento escalonado, com sincronização do ciclo estral pelo efeito Whitten e confirmação da cópula pelo tampão vaginal (E0). No E12, os grupos ZIKV e coinfecção receberam 10^5 PFU de ZIKV por via intraperitoneal, enquanto os controles e o grupo de monoinfecção receberam PBS. Os neonatos são submetidos à perfusão transcardíaca e coleta do encéfalo. Até o momento, os protocolos de infecção, acasalamento, inoculação viral e perfusão foram estabelecidos e estão em execução. O acasalamento ainda não foi concluído para todas as fêmeas, e a casuística neonatal permanece em formação. ELISA e imuno-histoquímica serão iniciados como etapas futuras da análise do modelo ME-49.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Vírus Zika. Coinfecção. Neuroinflamação.

TITLE: Experimental Toxoplasmosis: Inflammatory Profile and the Role of Clonal and Atypical Strains of Toxoplasma gondii in Pathogenesis

Abstract

Congenital toxoplasmosis and vertical Zika virus (ZIKV) infection are recognized causes of fetal neurological damage. Maternal-fetal coinfection during pregnancy may modulate the immune response; however, experimental models reproducing this interaction are still lacking. This study aimed to establish and standardize a murine model of congenital coinfection with the ME-49 strain of *Toxoplasma gondii* and ZIKV. BALB/c females from the *T. gondii* monoinfection and coinfection groups were orally inoculated with 15 tissue cysts of the ME-49 strain. After 20 days, mating was initiated in a staggered manner, with estrous cycle synchronization by the Whitten effect and copulation confirmed by the vaginal plug (E0). At E12, the ZIKV and coinfection groups received 10^5 PFU of ZIKV intraperitoneally, while the control and monoinfection groups received PBS. Neonates undergo transcardiac perfusion and brain collection. To date, the infection, mating, viral inoculation, and perfusion protocols have been established and are ongoing. Mating has not yet been completed for all females, and the neonatal sample size is still being established. ELISA and immunohistochemistry will be initiated as future steps in the analysis of the ME-49 model.

Keywords: Toxoplasmosis. Zika virus. Coinfection. Neuroinflammation.

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Embora a infecção seja frequentemente assintomática em indivíduos imunocompetentes, a transmissão vertical durante a gestação pode resultar em toxoplasmose congênita, condição potencialmente grave associada a alterações neurológicas e oculares, além de restrição do desenvolvimento fetal (AHMED; SOOD; GUPTA, 2020; DUBEY et al., 2021). Durante a gestação, a resposta imune deve conciliar o controle da infecção com a manutenção da homeostase materno-fetal. Após a transmissão transplacentária , *T. gondii* pode alcançar o sistema nervoso central (SNC) fetal e infectar neurônios, astrócitos e micróglia. A ativação dessas células promove a produção de mediadores pró-inflamatórios , como IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ, além de quimiocinas envolvidas no recrutamento de leucócitos para o tecido nervoso. Embora essenciais para limitar a disseminação parasitária, essas respostas podem contribuir para neuroinflamação persistente e lesão tecidual (MATTA et al., 2021; BRITO et al., 2022; MEURER et al., 2020). No Rio Grande do Norte, há alta diversidade genética de *T. gondii*, com ocorrência de genótipos não arquetípicos (CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013), os quais podem induzir respostas imunológicas distintas das observadas em linhagens clonais clássicas (BRITO et al., 2023b). Esse cenário reforça a importância de investigar a interação entre diferentes genótipos do parasito e outros agentes neurotrópicos. Nesse contexto, a coinfecção por *T. gondii* e vírus Zika (ZIKV) pode alterar a homeostase parasito-hospedeiro, modulando a resposta inflamatória materno-fetal, de modo dependente do genótipo parasitário. A cepa ME-49, pertencente ao genótipo clonal tipo II, apresenta virulência intermediária em modelos murinos, capacidade de formar cistos e estabelecer infecção crônica, sendo amplamente utilizada como modelo experimental para estudos de neurotoxoplasmose (BRITO et al., 2023a). Em contraste, a cepa

CK-2 representa uma linhagem não arquetípica de *T. gondii*, na América do Sul. Genótipos não arquetípicos podem apresentar maior virulência e disseminação tecidual e induzir respostas inflamatórias mais intensas que linhagens clonais, embora essas características variem entre os isolados (SU et al., 2012; BRITO et al., 2023b). Paralelamente, o vírus Zika (ZIKV), arbovírus pertencente ao gênero Flavivirus, tornou-se um importante problema de saúde pública após a epidemia ocorrida nas Américas entre 2015 e 2016, quando foi estabelecida sua associação com alterações congênitas (RATHORE et al., 2019). Além da transmissão vetorial, o vírus pode ser transmitido verticalmente e infectar células progenitoras neurais, astrócitos e micróglia. A infecção desencadeia respostas inflamatórias, com produção de interferons do tipo I, IL-1β, IL-6, TNF-α e quimiocinas que promovem ativação microglial, apoptose celular e alterações da neurogênese, contribuindo para a Síndrome Congênita do Vírus Zika, caracterizada principalmente por microcefalia e outras alterações neurológicas (REID; RIMMER; THAKUR, 2018; DITTMAR; MELO; AGUIAR, 2024; SANTANA et al., 2025). A partir dessa plataforma pré-clínica, a presente proposta amplia o escopo investigativo ao incorporar a coinfecção por ZIKV, para avaliar como a interação entre esse arbovírus neurotrópico e as cepas clonal ME-49 e não arquetípica CK-2 de *T. gondii* influencia a resposta imune, a homeostase parasito-hospedeiro e os desfechos da infecção congênita. O estudo constitui desdobramento do plano de trabalho anteriormente desenvolvido pelo grupo intitulado: “Análise do perfil inflamatório e seu papel na patogênese cerebral em modelo experimental de infecção por cepas atípicas de *Toxoplasma gondii*.”

Metodologia

Ética e animais. O delineamento deste estudo segue as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Certificado nº 459.041/2025).

Grupos experimentais. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: (i) controle; (ii) monoinfecção por *T. gondii* (cepa ME-49); (iii) monoinfecção por ZIKV; (iv) coinfecção ME-49 + ZIKV. Neste plano de trabalho utilizou-se exclusivamente a cepa ME-49.

Infecção por *T. gondii*. Inicialmente, foi acompanhado o processo de seleção de um camundongo BALB/c doador de cistos teciduais com período de infecção superior a 20 dias. A quantificação da carga parasitária foi realizada por meio de craniotomia e exérese asséptica do encéfalo (MEURER et al., 2020). O tecido foi submetido à maceração mecânica com pistilo estéril, adicionando-se PBS gradualmente até completa homogeneização. Para a contagem dos cistos, alíquotas de 20 µL do homogenato encefálico foram dispensadas em lâminas e analisadas em microscópio óptico (LIU et al., 2015). A varredura inicial foi realizada sob aumento de 100×, seguida de análise em 400× para identificação de cistos viáveis contendo bradizoítos. O procedimento foi executado em triplicata para padronização do inóculo pela média da concentração parasitária. Posteriormente, calculou-se a diluição em PBS para

obtenção da dose de 15 cistos em volume final de 200 µL. Os animais dos grupos coinfecção e monoinfecção por *T. gondii* foram infectados por via oral (per gavage), utilizando cânula orogástrica metálica apropriada, assegurando a deposição gástrica do inóculo.

Acasalamento. Decorridos 20 dias após a infecção, intervalo necessário para o estabelecimento da fase crônica da toxoplasmose (BRITO et al., 2023a), as fêmeas foram submetidas ao acasalamento escalonado. Para indução e sincronização do ciclo estral pelo efeito Whitten, frações de maravalha previamente utilizadas nas caixas dos machos reprodutores e impregnadas com feromônios urinários foram transferidas para as caixas das fêmeas. Estas foram alojadas na proporção de duas por caixa e permaneceram em ambientação e estimulação neuroendócrina por 48 horas. Após esse período, um macho foi introduzido em cada caixa, estabelecendo-se o sistema de harém (1 macho:2 fêmeas) durante o período noturno. Na manhã seguinte (7h00–9h00), aproximadamente 14–16 horas após a cópula, realizou-se inspeção visual da região vulvar para detecção do plug vaginal, considerado critério confirmatório da cópula e marcador do Dia 0 do Desenvolvimento Embrionário (E0). As fêmeas com acasalamento confirmado foram individualizadas em gaiolas de gestação, permanecendo sob monitoramento clínico até o E12, momento da inoculação do ZIKV (ASGARI et al., 2015; ARRANZ-SOLÍS; MUKHOPADHYAY; SAEIJ, 2021).

Infecção por ZIKV. No E12, período crítico para infecções congênitas (OSTRANDER; BALE, 2019), os grupos coinfecção e monoinfecção por ZIKV receberam o vírus Zika. As amostras virais foram cedidas e certificadas pelo Laboratório de Desenvolvimento Neural Ambiental do Instituto do Cérebro da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (ICe-UFRN). Em condições de biossegurança NB-2, as alíquotas foram retiradas do ultrafreezer a −80 °C e descongeladas em banho de gelo. Para a preparação da dose, realizou-se diluição 1:4, combinando 20 µL da suspensão viral (10^5 PFU) com 80 µL de PBS estéril, totalizando 200 µL por animal. A administração foi realizada por via intraperitoneal no quadrante inferior do abdome, utilizando seringas de insulina estéreis com agulhas ultrafinas. Os grupos controle e monoinfecção por *T. gondii* receberam, pela mesma via, 200 µL de PBS estéril.

Perfusão e encefalotomia. Os neonatos foram anestesiados por via intraperitoneal com solução anestésica contendo solução salina, xilazina e quetamina, na proporção de 10,25:1:1,25, respectivamente, em volume final de 100–150 µL por animal, ajustado ao tamanho dos animais. Após confirmação do plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à toracotomia para exposição do coração. A perfusão transcardíaca foi realizada inicialmente com 10 mL de solução salina, em fluxo constante, para remoção do sangue intravascular. Em seguida, procedeu-se à perfusão com 10 mL de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato, visando à fixação dos tecidos. Ao término da perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente dissecados e submetidos à pós-fixação em PFA a 4% por aproximadamente 24 horas, a 4 °C. Posteriormente, foram encaminhados para processamento histológico (WU et al., 2021).

A avaliação sorológica das matrizes, por meio de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detecção de IgG anti-*Toxoplasma gondii*, bem como a análise imuno-histoquímica dos encéfalos neonatais, ainda não foram realizadas. Essas etapas estão previstas para a continuidade do estudo e, portanto, serão apresentadas posteriormente como análises a serem realizadas, não integrando os resultados obtidos até o momento.

Resultados e Discussões

O acasalamento ainda não foi concluído para todas as fêmeas, de modo que a casuística neonatal permanece em formação. Consequentemente, ainda não é possível estabelecer o número amostral (n) final por grupo ou realizar análises estatísticas referentes aos desfechos reprodutivos, histológicos ou imunológicos. Nesse contexto, o principal resultado obtido até o momento consiste na padronização operacional da cadeia experimental destinada ao estudo da coinfecção congênita por *Toxoplasma gondii* (ME-49) e ZIKV em camundongos BALB/c. Foram estabelecidas, de forma sequencial, as principais etapas do modelo: (i) obtenção e quantificação de cistos teciduais a partir de doador cronicamente infectado; (ii) inoculação oral de 15 cistos em 200 µL nas fêmeas dos grupos ME-49 e coinfecção; (iii) período de 20 dias para o estabelecimento da fase crônica; (iv) acasalamento mediante protocolo de indução do efeito Whitten; (v) inoculação intraperitoneal de 10^5 PFU de ZIKV (ou PBS) no E12; e, posteriormente (vi) anestesia, perfusão transcardíaca e coleta de encéfalos dos neonatos já obtidos.

A execução dessas etapas estabelece a base experimental necessária para a avaliação dos efeitos da infecção congênita isolada e da coinfecção sobre o tecido encefálico neonatal. As análises imunohistoquímica, ainda pendentes, permitirão caracterizar alterações na resposta imune local e possíveis diferenças na distribuição e intensidade dos marcadores avaliados entre os grupos experimentais. Além disso, espera-se identificar as regiões encefálicas que apresentem maior comprometimento, possibilitando, posteriormente, relacionar essas alterações com possíveis prejuízos cognitivos e comportamentais observados nos animais. A comparação entre animais controle, monoinfectados por *T. gondii* ou ZIKV e coinfectados será fundamental para determinar se a presença simultânea dos dois agentes está associada a alterações distintas da resposta neuroimune em relação às infecções isoladas.

A caracterização das regiões encefálicas potencialmente mais afetadas também poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos associados à infecção congênita. Entretanto, eventual relação entre alterações histológicas ou imunológicas e prejuízos cognitivos e comportamentais deverá ser estabelecida de forma integrada, mediante dados provenientes de avaliações específicas desses desfechos, não podendo ser inferida exclusivamente a partir das alterações teciduais.

Como etapa subsequente, será realizada a quantificação de citocinas séricas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA), com ênfase em mediadores associados à resposta inflamatória. A integração desses dados com os achados da análise imuno-histoquímica permitirá comparar os componentes sistêmico e neuroimune da resposta à infecção, contribuindo para testar a hipótese de que a coinfecção por *T. gondii* e ZIKV modifica a resposta imunológica durante o desenvolvimento fetal e neonatal.

Após a caracterização do modelo utilizando a cepa clonal ME-49, a mesma abordagem experimental será aplicada à cepa não arquetípica CK-2. Essa etapa permitirá avaliar se o perfil imunológico e as alterações encefálicas associadas à coinfecção são influenciados pelo genótipo parasitário, possibilitando a comparação entre uma linhagem clonal e uma cepa não arquetípica de *T. gondii*. Dessa forma, a continuidade do estudo deverá ampliar a compreensão sobre a influência da diversidade genética do parasito na interação com o ZIKV e na resposta imune associada à infecção congênita.

Conclusão

Este estudo permitiu estabelecer e executar a plataforma experimental utilizando o modelo murino para investigação da coinfecção congênita por *Toxoplasma gondii* e pelo vírus Zika (ZIKV), incluindo as principais etapas de infecção, gestação, obtenção dos neonatos e coleta de tecido encefálico. Embora as análises histológicas e imunológicas ainda estejam em andamento, o modelo estabelecido constitui uma ferramenta experimental necessária para investigar, de forma comparativa, os efeitos das infecções isoladas e da coinfecção sobre o sistema nervoso central durante o período neonatal. Nas etapas subsequentes, as análises imuno-histoquímicas e a quantificação de citocinas permitirão caracterizar as alterações da resposta imune local e sistêmica associadas às diferentes condições experimentais, possibilitando testar a hipótese de que a interação entre *T. gondii* e ZIKV modifica a resposta imunológica durante a infecção congênita. A utilização da cepa não arquetípica CK-2, que será incorporada ao modelo, permitirá adicionalmente, avaliar a influência do perfil genético do parasito sobre essa interação, comparando seus efeitos com aqueles observados para a cepa clonal ME-49. Por fim, a continuidade desse projeto poderá contribuir para elucidar mecanismos de imunomodulação decorrentes da coinfecção e ampliar a compreensão da interação entre agentes neurotrópicos durante o desenvolvimento fetal e neonatal. Além disso, a integração dos achados imunológicos e histopatológicos com avaliações futuras de desfechos neurológicos poderá fornecer subsídios para compreender possíveis repercussões dessas infecções sobre o desenvolvimento do sistema nervoso. Portanto, o modelo estabelecido representa uma plataforma pré-clínica promissora para o estudo das consequências biológicas de infecções concomitantes durante a gestação e da influência da diversidade genética de *T. gondii* sobre a resposta à infecção por ZIKV.

Referências

AHMED, Maimoona; SOOD, Akanksha; GUPTA, Janesh. Toxoplasmosis in pregnancy. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 255, p. 44-50, 2020. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2020.10.003.

ARRANZ-SOLÍS, David; MUKHOPADHYAY, Debanjan; SAEIJ, Jeroen P. J. Toxoplasma effectors that affect pregnancy outcome. Trends in Parasitology, v. 37, n. 4, p. 283-295, 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2020.10.013.

ASGARI, Qasem; KESHAVARZ VALIAN, Hossein; REZAEIAN, Mostafa; SHOJAEE, Saeedeh; MEHRABANI, Davood. Toxoplasma gondii: sexual transmission in mice. Journal of Parasitic Diseases, v. 39, n. 2, p. 253-257, 2015. DOI: 10.1007/s12639-013-0330-5.

BRITO, Ramayana Morais de Medeiros et al. Chronic infection by atypical Toxoplasma gondii strain induces disturbance in microglia population and altered behaviour in mice. Brain, Behavior, & Immunity - Health, v. 30, p. 100652, 2023. DOI: 10.1016/j.bbih.2023.100652.

BRITO, Ramayana Morais de Medeiros et al. Chronic Toxoplasma gondii infection contributes to perineuronal nets impairment in the primary somatosensory cortex. Parasites & Vectors, v. 15, n. 1, p. 487, 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05596-x.

BRITO, Ramayana Morais de Medeiros et al. Genetic diversity of Toxoplasma gondii in South America: occurrence, immunity, and fate of infection. Parasites & Vectors, v. 16, p. 461, 2023. DOI: 10.1186/s13071-023-06080-w.

CLEMENTINO ANDRADE, M. M. et al. New genotypes of Toxoplasma gondii obtained from farm animals in Northeast Brazil. Research in Veterinary Science, v. 94, n. 3, p. 587-589, 2013. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.01.006.

DITTMAR, Ana Cláudia Martins; MELO, Daienne Borges; AGUIAR, Gabriela Ribeiro; TERRIBELE, Jéssica. Caracterização da infecção placentária pelo vírus Zika em humanos: uma revisão da literatura. Archives of Health, v. 5, n. 3, e2149, 2024. DOI: 10.46919/archv5n3espec-459.

DUBEY, J. P.; MURATA, F. H. A.; CERQUEIRA-CÉZAR, C. K.; KWOK, O. C. H.; VILLENA, I. Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. Parasitology, v. 148, n. 12, p. 1406-1416, 2021. DOI: 10.1017/S0031182021001013.

LIU, Quan; WANG, Ze-Dong; HUANG, Si-Yang; ZHU, Xing-Quan. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii. Parasites & Vectors, v. 8, p. 292, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0902-6.

MATTA, Sumit K.; RINKENBERGER, Nicholas; DUNAY, Ildikó R.; SIBLEY, L. David. Toxoplasma gondii infection and its implications within the central

nervous system. Nature Reviews Microbiology, v. 19, p. 467-480, 2021. DOI: 10.1038/s41579-021-00518-7.

MEURER, Ywlliane da Silva Rodrigues et al. Toxoplasma gondii infection damages the perineuronal nets in a murine model. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 115, e200007, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760200007.

OSTRANDER, Betsy; BALE, James F. Congenital and perinatal infections. In: Handbook of Clinical Neurology. v. 162. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 133-153. DOI: 10.1016/B978-0-444-64029-1.00006-0.

RATHORE, Abhay P. S.; SARON, Wilfried A. A.; LIM, Ting; JAHAN, Nusrat; ST JOHN, Ashley L. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. Science Advances, v. 5, n. 2, eav3208, 2019. DOI: 10.1126/sciadv.aav3208.

REID, Savina; RIMMER, Kathryn; THAKUR, Kiran. Zika virus and neurologic disease. Neurologic Clinics, v. 36, n. 4, p. 767-787, 2018. DOI: 10.1016/j.ncl.2018.06.003.

SANTANA, Lucas Matheus Barreto et al. Zika Virus: A Review of Biology, Clinical Impacts, and Coinfections. Viruses, v. 17, n. 5, p. 637, 2025. DOI: 10.3390/v17050637.

SU, Chunlei et al. Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1203190109.

WU, Jinyun; CAI, Yuqi; WU, Xiaoyang; YING, Yue; TAI, Yilin; HE, Miao. Transcardiac perfusion of the mouse for brain tissue dissection and fixation. Bio-protocol, v. 11, n. 5, e3988, 2021. DOI: 10.21769/BioProtoc.3988.

CÓDIGO: SB0652

AUTOR: EMILLANE ALANDA PAIVA

ORIENTADOR: JANEUSA TRINDADE DE SOUTO

TÍTULO: Perfil de marcadores da imunidade inata em pacientes com dengue grave na presença da infecção crônica por Toxoplasma gondii

Resumo

A toxoplasmose e a dengue representam grandes desafios de saúde pública, compartilhando uma expressiva taxa de prevalência em regiões de clima tropical. A infecção crônica por Toxoplasma gondii é caracterizada pela persistência do parasito e por uma resposta imune Th1 contínua, marcada pela produção persistente de IFN- e óxido nítrico. Esse perfil inflamatório tem o potencial de modular a reatividade do sistema imunológico a infecções subsequentes. Por outro lado, a dengue grave é impulsionada por uma resposta imune desregulada, em que a ativação exacerbada de receptores de reconhecimento de padrão e a tempestade de citocinas pró-inflamatórias culminam em disfunção endotelial, extravasamento plasmático e distúrbios de coagulação. Apesar da prevalência de ambas e do potencial de exacerbação imunológica mútua, os mecanismos pelos quais a infecção crônica por T. gondii afeta o perfil da imunidade inata na dengue grave precisam ser estudados.

Palavras-chave: Dengue grave. Toxoplasma gondii. Coinfecção. Perfil de citocinas.

TITLE: Innate immune marker profile in severe dengue patients with chronic Toxoplasma gondii infection

Abstract

Toxoplasmosis and dengue represent major public health challenges, sharing high prevalence rates in tropical regions. Chronic Toxoplasma gondii infection is characterized by parasite persistence and a continuous Th1 immune response, marked by sustained production of IFN- and nitric oxide. This inflammatory profile has the potential to modulate the immune system's reactivity to subsequent infections. On the other hand, severe dengue is driven by a dysregulated immune response, in which the exacerbated activation of pattern recognition receptors and a pro-inflammatory cytokine

storm lead to endothelial dysfunction, plasma leakage, and coagulation disorders. Despite the high prevalence of both conditions and the potential for mutual immunological exacerbation, the mechanisms by which chronic T. gondii infection affect the innate immune profile in severe dengue require further investigation.

Keywords: Severe dengue. Toxoplasma gondii. Coinfection. Cytokine profiles.

Introdução

A Toxoplasmose é uma infecção amplamente distribuída no mundo, com taxas de prevalência que podem chegar a 90% conforme a região, apresentando maior prevalência em regiões de clima tropical (Flegr et al., 2014). A importância da infecção por T. gondii ganha uma atenção especial em casos de coinfecção com outros patógenos, como bactérias, vírus e helmintos (Ahmed et al., 2017; Romano et al., 2013; Souza et al., 2017; Wang et al., 2017; Zhao et al., 2017). O impacto da infecção prévia, concomitante a outras infecções adquiridas subsequentemente, se dá pelo perfil inflamatório estimulado pela presença do T. gondii (Ahmed et al., 2017; Souza et al., 2017; Xu et al., 2020). Por ser um parasito intracelular obrigatório, o T. gondii é capaz de infectar todos os tipos de células nucleadas e se disseminar por todos os tecidos do organismo hospedeiro. Após infecção, esse parasito é capaz de estimular a ativação clássica de macrófagos e direcionar a diferenciação de linfócitos T CD4 de perfil Th1, capaz de induzir uma inflamação persistente, caracterizada por níveis elevados de IFN-γ e produção constante de óxido nítrico (Lang; Gross; Lüder, 2007).

A dengue não é amplamente distribuída pelo mundo, mas divide com a toxoplasmose a prevalência em regiões de clima tropical. Por ser uma doença que tem um quadro inflamatório intenso, pode exacerbar outras doenças infecciosas ou inflamatórias, caso ocorra de forma concomitante.

Ao entrar na célula, a presença do vírus da dengue é sentida por TLRs e sensores citosólicos da imunidade inata, RIG-I e MDA-5, desencadeando a produção de interferons do tipo I (IFNs α e β), estabelecendo um estado antiviral em células adjacentes, bem como na própria célula infectada. A produção de IFNs tipo I inibe a infecção por DENV de outros monócitos. A interação do DENV e suas proteínas (NS1), com alguns TLRs e com proteínas do complemento, estimula vias de inflamação que, se acionadas de forma exacerbada, podem causar o quadro grave de dengue, com dano vascular e extravasamento de plasma para os tecidos e coagulopatias (Avirutnan et al., 2006; Modhiran et al., 2015).

A patogênese da dengue é atribuída a vários fatores virais e do hospedeiro, como a proteína NS1, variação do genoma do DENV, RNA subgenômico, anticorpos anti-DENV NS1, bem como o aprimoramento de infecção dependente de anticorpos e células T reativas de memória. No entanto, as razões pelas quais alguns pacientes evoluem para formas graves e potencialmente fatais da doença da dengue permanecem desconhecidas. Fatores de risco associados ao hospedeiro, incluindo exposição prévia ao DENV, comorbidade e predisposição genética, estão entre aqueles que podem estar

envolvidos na possibilidade do desenvolvimento da forma grave da doença (Rathore; Farouk; St. John, 2020).

Diante disso, nossa hipótese central é que a infecção crônica por Toxoplasma gondii altera a resposta imunológica em indivíduos com dengue grave, possivelmente exacerbando a resposta inflamatória e contribuindo para um desfecho clínico mais grave. Especulamos que a presença de T. gondii pode resultar em uma hiperativação do sistema imunológico, potencialmente levando a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias que exacerbam o quadro de dengue, além de modificar a atividade leucocitária e a expressão de genes associados à resposta imunológica.

Metodologia

1. Desenho do estudo. Trata-se de um estudo caso-controle para caracterização do perfil clínico-laboratorial e imunológico das pessoas infectadas com DENV na presença ou não de toxoplasmose crônica. O estudo está sendo realizado no Laboratório de Imunofarmacologia (LIF) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) do Centro de Biociências (CB) da UFRN em parceria com as seguintes instituições coparticipantes: Hospital Giselda Trigueiro (HGT), Hospital do Coração (HCor), Laboratório de Biologia Molecular das Doenças Infecciosas e do Câncer /DMP/UFRN, Laboratório de Malária e Toxoplasmose/DMP/UFRN, Laboratório de Imunologia das Interações Parasitárias (Departamento de Parasitologia/UFMG). Para os pacientes que aceitaram participar da pesquisa até agora, foram entregues duas cópias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para leitura, assinatura e datação. Uma cópia ficou com o participante da pesquisa, e a outra cópia com o pesquisador responsável pelo projeto. Todas as dúvidas relativas aos objetivos, importância, metodologia, riscos, desconfortos, benefícios e direitos foram esclarecidas para a devida assinatura do TCLE.

2. Coleta de sangue periférico e sorologia anti-T. gondii. Sangue periférico de 4 pacientes (4 mL) ou indivíduos saudáveis foi coletado por venipuntura, em tubos contendo EDTA ou ativador de coágulo, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Nos pacientes, foram coletadas 2 amostras de 4 mL cada de sangue total, uma destinada à extração de material genético para estudos de expressão de genes envolvidos na resposta imunológica inata, coletadas em tubo contendo EDTA e outra coletada em tubo com ativador de coágulo, para obtenção de soro por centrifugação a 250 x g, por 10 minutos, a 4°C. O soro obtido foi aliquotado e estocado para realização de sorologia para detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii. O soro dos doadores ainda será testado para presença de IgG anti-Toxoplasma gondii utilizando o kit “Biolisa Toxoplasmose IgG” de acordo com o protocolo do fabricante.

3. Isolamento de leucócitos totais do sangue periférico para avaliação da expressão gênica de marcadores da imunidade inata nos leucócitos dos pacientes. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 250 × g, à temperatura ambiente. O plasma foi retirado e as células incubadas com tampão de lise de hemácias por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 250 x g, à temperatura ambiente, o sobrenadante desprezado e os

leucócitos diluídos em solução salina estéril, livre de RNAse, para retirada de tampão de lise residual.

Os leucócitos isolados do sangue total dos pacientes foram incubados com TRIzol® (Sigma-Aldrich) para isolamento do RNA, produção de um DNA complementar e avaliação da expressão de genes que codificam mediadores das imunidades inata, como as citocinas pró-inflamatórias IFN-alfa, IFN-beta, TNF, IL-1β, IL-6 e IL-18 e as anti-inflamatórias IL-10 e TGF-beta. Os receptores de reconhecimento de padrões moleculares e suas moléculas adaptadoras RIG, MDA-5, TLR-3, TLR7, NLRP3, ASC e Caspases-1 e as moléculas de sinalização Myd88, NFB, TRIF, IRF1, IRF3 e IRF7.

3.1 Obtenção do RNA: para cada 1 mL de amostras contendo os leucócitos totais incubadas com o reagente Trizol, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio. Após isso, os tubos passaram pelo vórtex e depois foram centrifugados, durante 15 min, a 13.000 rpm, a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi coletada e adicionada em tubos eppendorfs, RNAse/DNAse free, novos. Nestes tubos, foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, e as amostras incubadas a -20°C, durante 15 minutos. Decorrido esse intervalo de tempo, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, a 4° C, durante 15 minutos. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e adicionados 0,5 ml de álcool etílico PA ao pellet de RNA, sendo esse material passado em vórtex e novamente centrifugados a 13.000 rpm, a 4° C, durante 15 min. Ao término dessa etapa, o sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos sobre papel filtro, a fim de secar o excesso de álcool da amostra de RNA obtido. Em seguida, o RNA purificado foi ressuspendido em 50 microlitros de água MilliQ RNAse free e uma alíquota usada para determinar a concentração e a qualidade dos mRNAs extraídos utilizando Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies).

Resultados e Discussões

Visto que foi um ano atípico para a quantidade de casos de Dengue, houve uma baixa coleta de amostras de pacientes. No total, foram obtidas amostras de quatro pacientes cujo RNA obtido das células sanguíneas foi isolado e o soro aliquotado. Dessa forma, aguardam-se novos pacientes para dar continuidade a análise de seu soro.

Apesar disso, outras atividades do laboratório foram acompanhadas pelos discentes de iniciação científica, além de discussão e artigos científicos e treinamento em diversas técnicas desenvolvidas no Laboratório de Imunofarmacologia.

Conclusão

Conclui-se que o projeto é de extrema importância para o estudo desse tipo de coinfecção, no entanto, aguarda-se a chegada de novos pacientes para que as análises possam ser continuadas.

Referências

AHMED, N. et al. Toxoplasma Co-infection Prevents Th2 Differentiation and Leads to a Helminth-Specific Th1 Response. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, 25 jul. 2017.

AVIRUTNAN, P. et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. The Journal of Infectious Diseases, v. 193, n. 8, p. 1078–1088, 15 abr. 2006.

FLEGR, J. et al. Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. PLoS ONE, v. 9, n. 3, p. e90203, 24 mar. 2014.

LANG, C.; GROSS, U.; LÜDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by Toxoplasma Gondii. Parasitology Research, v. 100, n. 2, p. 191–203, 6 jan. 2007.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. Science Translational Medicine, v. 7, n. 304, 9 set. 2015.

PANDEY, S. et al. Outcome of adult malarial co-infections in Eastern India. Journal of Global Infectious Diseases, v. 14, n. 2, p. 57, 2022.

RATHORE, A. P.; FAROUK, F. S.; ST. JOHN, A. L. Risk factors and biomarkers of severe dengue. Current Opinion in Virology, v. 43, p. 1–8, ago. 2020.

ROMANO, J. D. et al. Fierce Competition between Toxoplasma and Chlamydia for Host Cell Structures in Dually Infected Cells. Eukaryotic Cell, v. 12, n. 2, p. 265–277, fev. 2013.

SOUZA, M. C. et al. Chronic Toxoplasma gondii Infection Exacerbates Secondary Polymicrobial Sepsis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, 7 abr. 2017.

WANG, Z.-D. et al. Prevalence and burden of Toxoplasma gondii infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. The Lancet HIV, v. 4, n. 4, p. e177–e188, abr. 2017.

XU, F. et al. Prior Toxoplasma Gondii Infection Ameliorates Liver Fibrosis Induced by Schistosoma Japonicum through Inhibiting Th2 Response and Improving Balance of Intestinal Flora in Mice. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 8, p. 2711, 14 abr. 2020.

ZHAO, Y.-J. et al. First Report of Toxoplasma gondii Infection in Tuberculosis Patients in China. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v. 17, n. 12, p. 799–803, dez. 2017.

CÓDIGO: SB0658

AUTOR: JOAO PEDRO LEMOS E SILVA RODRIGUES

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR TIPO 4

Resumo

A lipodistrofia parcial familiar do tipo 4 (LPF4), causada por mutações no gene PLIN1, é uma doença rara e frequentemente subdiagnosticada, ela é caracterizada por perda de gordura em membros inferiores e glúteos, e associada a complicações metabólicas como resistência à insulina, hipertrigliceridemia e esteatose hepática. Neste trabalho, mutações frameshift já descritas na literatura para PLIN1 foram analisadas por meio de predição estrutural. Os resultados mostraram um padrão consistente entre as variantes: a região N-terminal (domínio PAT) apresentou confiabilidade médio-alta, enquanto a região C-terminal, intrinsecamente desordenada mesmo na proteína selvagem, manteve baixa confiabilidade nas variantes mutadas. Observou-se ainda que mutações distintas (deleções, inserção e duplicação) convergem para uma mesma sequência C-terminal aberrante, sugerindo que essa região compartilhada pode ter papel relevante na patogênese da LPF4, hipótese que ainda requer validação futura.

Palavras-chave: Gordura; Doenças Raras; Lipodistrofia; Perilipina-1.

TITLE: MOLECULAR ANALISYS OF PACIENTS WITH FAMILIAR PARTIAL LIPODYSTROPHY TYPE 4

Abstract

Familial Partial Lipodystrophy Type 4 (FPLD4), is caused by mutations in the PLIN1 gene, is a rare and frequently underdiagnosed disease characterized by fat loss in the lower limbs and glutes and associated with metabolic complications such as insulin resistance, hypertriglyceridemia, and hepatic steatosis. In this study, frameshift mutations in PLIN1 previously described in the literature were analyzed using structural prediction. The results showed a consistent pattern across the variants: the N-terminal region (PAT domain) exhibited medium-to-high confidence, whereas the C-terminal region—intrinsically disordered even in the wild-type protein—showed low confidence in the mutant variants. It was also observed that distinct mutations (deletions, an insertion, and a duplication) converge on the same aberrant C-terminal sequence, suggesting that this shared region may play a significant role in the pathogenesis of FPLD4—a hypothesis that requires further validation.

Keywords: Fat tissue; Rare diseases; Lipodystrophy; Perilipin-1.

Introdução

O tecido adiposo foi estudado ao longo do tempo principalmente pela sua função de armazenamento energético em forma de triglicerídeos, porém, atualmente o conhecimento sobre esse tecido tem avançado e funções como regulação endócrina, metabólica e imunológica também ganharam notoriedade. As adipocinas, por exemplo, moléculas secretadas pelos adipócitos, desempenham papel de sinalizadoras do metabolismo energético, sendo consideradas essenciais na homeostase do organismo, onde indicam estados de apetite e saciedade [1]. Portanto, em situações em que o tecido adiposo se vê desregulado, afetando seus processos fisiológicos, a ocorrência de doenças relacionadas ao metabolismo energético é recorrente, como a obesidade e o diabetes tipo II. Entretanto, outras doenças relacionadas ao tecido adiposo, como as lipodistrofias, são muitas vezes subdiagnosticadas, seja por terem sintomas parecidos a outras doenças metabólicas, ou pela necessidade de um diagnóstico genético. As lipodistrofias são um grupo de doenças heterogêneas relacionadas com a disfunção do tecido adiposo, caracterizadas pela ausência do tecido que podem se manifestar de forma localizada, parcial ou generalizada, e por complicações metabólicas como o diabetes, hipertrigliceridemia e esteatose. As lipodistrofias são categorizadas pela distribuição da ausência de gordura (parcial ou generalizada), e por sua etiologia (adquirida ou genética) [2]. Consideradas doenças extremamente raras, as lipodistrofias parciais familiares (LPF) e a generalizada (LCG) possuem prevalência estimada de 1,3–4,7 casos por milhão [3]. Lipodistrofias parciais familiares representam um grupo de doenças de padrão autossômico dominante [4], caracterizadas pela perda parcial do tecido adiposo, tipicamente no final da infância e início da adolescência. Diversos genes já foram descritos por ter relação com a LPF, como PPARG, AKT2, CAV1, PLIN1 e outros. Esse painel de genes resulta nos vários tipos de lipodistrofias parciais familiares que existem, onde podem ser diferenciados principalmente por qual região do corpo é mais afetada pela ausência de gordura [5]. A lipodistrofia parcial do tipo 4 (LPF4) é um dos subtipos de lipodistrofia e está relacionada à PLIN1, gene que codifica a peripilina-1, uma proteína expressa em adipócitos e células espumosas [6], que atua se ancorando nas gotículas lipídicas e mediando o acesso de lipases. Na LPF4, a lipoatrofia se concentra nos membros inferiores e glúteos, acompanhada da hipertrofia muscular de regiões como a panturrilha, e de aspecto acromegalóide na face, mãos e pés [7] [8] [9]]; além dos sinais macroscópicos, a LPF4 apresenta complicações metabólicas como hipertrigliceridemia, esteatose hepática, resistência à insulina e diabetes. Diversas mutações em PLIN1 já foram descritas: estudos genéticos em cortes populacionais identificaram tanto variantes que segregavam em fenótipos não prejudiciais e até metabolicamente favoráveis [10], quanto variantes associadas ao fenótipo lipodistrófico e a aterosclerose associada à síndrome coronariana aguda (SCA) [8,11]. A lipodistrofia parcial familiar do tipo 4 e outras lipodistrofias genéticas são, no geral, doenças subdiagnosticadas, como demonstrado em Medeiros et al. (2017) [12], cujo estudo no estado do Rio Grande do Norte demonstrou alta prevalência da Lipodistrofia Congênita Generalizada na região. Uma investigação mais ampla pode, portanto, sugerir a prevalência de outras lipodistrofias, como a LPF tipo 4. Associado também à heterogeneidade das variantes de PLIN1, a classificação das mutações envolvidas é essencial para compreender seu impacto na estrutura da proteína e sua patogenicidade. Este ano, foi visado a ampliação

da caracterização estrutural de outras mutações no gene PLIN1 que segregam para LPF4, bem como a avaliação do seu impacto na função da proteína.

Metodologia

Esta pesquisa faz parte do projeto "Lipodistrofia Congênita Parcial: Estão Os Pacientes Sendo Tratados Como Diabéticos Tipo 2?" o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRN - Hospital Universitário Onofre Lopes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - HUOL/UFRN, sob CAAE: 17211519.4.0000.5292 e número de parecer: 3.655.354. Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

De acordo com os objetivos propostos, será então realizada concomitantemente uma revisão bibliográfica através de artigos científicos que abordam o tema nas bases de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Google Acadêmico. O critério de inclusão para os artigos científicos consiste em: abordar a Lipodistrofia parcial familiar do tipo 4 em contexto clínico, molecular e/ou estudo de caso que contenha caso clínico descrito. Os critérios de exclusão são artigos científicos sobre outros subtipos de Lipodistrofia parcial, que não a do tipo 4 e artigos que continham exclusivamente pesquisa bibliográfica ou painéis de gene para varredura, ou seja, que descreviam novas variantes, mas não apresentavam caso clínico associado. (ρ).

1. Obtenção de sequências de PLIN1 mutadas e alinhamento As sequências de nucleotídeos do gene PLIN1 de tipo selvagem foram obtidas através do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), ID: NM_002666.5. As sequências mutadas utilizadas foram aquelas descritas em estudos anteriores até a data de julho de 2026, e obtidas através da ferramenta Mutalyzer [13], e alinhadas através de T-Coffe [14].

2.Análise bioinformática e predição da estrutura mutada Para realização de simulação bioinformática da estrutura proteica contendo as variantes encontradas neste trabalho serão utilizadas as ferramentas ChimeraX e AlphaFold Protein [15][16].

Resultados e Discussões

A perilipina-1 (PLIN1) é uma proteína que localiza-se externamente à gotícula lipídica dos adipócitos, regulando o acesso de lipases ao seu conteúdo e, assim, desempenhando um papel regulatório no processo de lipólise. A proteína, codificada por 8 éxons, é constituída por 4 domínios, que dão a PLIN1 sua capacidade de interagir com as lipases HSL e ATGL, e com a superfície da gotícula [16]. Mutações localizadas na porção final do gene são as que estão relacionadas aos diversos casos de Lipodistrofia Parcial Familiar do Tipo 4 presentes na literatura [7] [8], [9]. Todas possuem algo em comum: levam a um frameshift que, presume-se, afeta a capacidade de PLIN1 interagir com o cofator ABDH5, levando à incapacidade de inibir a lipólise pela ATGL [19].

Dando continuidade ao relatório anterior, foram investigadas as predições estruturais da perilipina-1 obtidas via AlphaFold de quase todas as mutações descritas. Assim, foi possível avaliar a predição estrutural obtidas do AlphaFold quanto a sua confiabilidade através do escore de pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) por resíduo. O padrão observado foi consistente entre as variantes analisadas: a região N-terminal, que corresponde ao domínio PAT da família das proteínas perilipinas [18], apresentou níveis de confiabilidade médio-altos (faixa azul, pLDDT = 90-70), indicando certo nível de confiança dessa região (Figura 1, 2, 3, e 4). Em contrapartida, a região C-terminal apresentou valores baixos de confiabilidade (faixa amarela à laranja, pLDDT = 50>) (Figura 1, 2, 3, e 4). Tal padrão já era esperado, tendo em vista que a região C-terminal da perilipina-1 é uma região intrinsecamente desordenada na proteína selvagem [18] (Figura 5).

Vale destacar que apesar das mutações frameshift manterem a estrutura da região C-terminal intrinsecamente desordenada (pLDDT = 50>), isto não implica que a funcionalidade da perilipina-1 permaneça a mesma. A partir do ponto de mutação, o frame de leitura dos códons está totalmente alterado, gerando uma composição de aminoácidos distinta daquela da proteína selvagem, e que, em todos os casos de LPF4, terá como consequência uma proteína mutada com número de aminoácidos maior do que os 522 originais. Além disso, a perilipina-1 possui em sua região C-terminal dois sítios de fosforilação que estão relacionados a sua interação com ABHD5, e que estão com seus aminoácidos alterados pelo frameshift.

Outra característica observada na análise comparativa das variantes frameshift de PLIN1 associadas à LPF4 é a convergência de distintas mutações para uma mesma sequência C-terminal mutada. As variantes c.1191_1192del(p.Val398Glyfs*166), c.1201_1202insT(p.Tyr401Leufs*165), c.1202_1205dup(p.Pro403Argfs*164) e c.1298delTG(p.Pro439Valfs*125) [8] [9] [20], embora originadas por alterações distintas (deleções, inserção e duplicação) em posições diferentes do éxon 9, resultam todas em no mesmo deslocamento de frame, levando à tradução do mesmo segmento de aminoácidos a jusante da mutação (Figura 6). Esse fenômeno já havia sido apontado por Gandotra et al [7] de que uma variante de splicing distinta (c.1210-1G>T, p.Leu404Alafs*158) produz coincidentemente a mesma proteína mutante alongada de outra mutação patogênica já descrita. Conclusão Os achados aqui reunidos, baseados em predições estruturais e na sistematização de dados já publicados, apontam direções promissoras para investigação futura. A convergência de variantes independentes para uma mesma sequência C-terminal aberrante levanta a questão de se essa região desordenada compartilhada desempenha papel ativo na patogênese da LPF4 — por exemplo, via interações anômalas com outros parceiros proteicos ou exposição de motivos normalmente protegidos na conformação nativa —, hipótese que ainda carece de validação experimental. À medida que ferramentas como o AlphaFold evoluem na modelagem de regiões intrinsecamente desordenadas, revisões futuras poderão se beneficiar de abordagens complementares — como dinâmica molecular ou validação biofísica — para consolidar o entendimento sobre o papel do C-terminal mutado de PLIN1 na fisiopatologia da LPF4.

Conclusão

Os achados aqui reunidos, baseados em predições estruturais e na sistematização de dados já publicados, apontam direções promissoras para investigação futura. A convergência de variantes independentes para uma mesma sequência C-terminal aberrante levanta a questão de se essa região desordenada compartilhada desempenha papel ativo na

patogênese da LPF4 — por exemplo, via interações anômalas com outros parceiros proteicos ou exposição de motivos normalmente protegidos na conformação nativa —, hipótese que ainda carece de validação experimental. À medida que ferramentas como o AlphaFold evoluem na modelagem de regiões intrinsecamente desordenadas, revisões futuras poderão se beneficiar de abordagens complementares — como dinâmica molecular ou validação biofísica — para consolidar o entendimento sobre o papel do C-terminal mutado de PLIN1 na fisiopatologia da LPF4.

Referências

[1] A. Booth, A. Magnuson, J. Fouts, and M. Foster, “Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion,” Horm Mol Biol Clin Investig, vol. 21, no. 1, 2015, doi: 10.1515/hmbci-2014-0037.

[2] R. J. Brown et al., “The diagnosis and management of lipodystrophy syndromes: A multi-society practice guideline,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 101, no. 12, 2016, doi: 10.1210/jc.2016-2466.

[3] E. Chiquette, E. A. Oral, A. Garg, D. Araújo-Vilar, and P. Dhankhar, “Estimating the prevalence of generalized and partial lipodystrophy: Findings and challenges,” Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, vol. 10, 2017, doi: 10.2147/dmso.s130810.

[4] I. Hussain and A. Garg, “Lipodystrophy Syndromes,” Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, vol. 45, no. 4. 2016. doi: 10.1016/j.ecl.2016.06.012.

[5] C. Bagias, A. Xiarchou, A. Bargiota, and S. Tigas, “Familial partial lipodystrophy (FPLD): Recent insights,” Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, vol. 13, 2020, doi: 10.2147/DMSO.S206053.

[6] B. C. G. Faber et al., “Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques,” Circ Res, vol. 89, no. 6, 2001, doi: 10.1161/hh1801.096340.

[7] Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, et al. Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. N Engl J Med. 2011;364(8):740-748. doi:10.1056/NEJMoa1007487

[8] I. Jéru et al., “Diagnostic Challenge in PLIN1-Associated Familial Partial Lipodystrophy,” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 104, no. 12, 2019, doi: 10.1210/jc.2019-00849.

[9] R. X. Chen et al., “The renal manifestations of type 4 familial partial lipodystrophy: A case report and review of literature,” BMC Nephrology, vol. 19, no. 1. 2018. doi: 10.1186/s12882-018-0913-6.

[10] K. A. Patel, S. Burman, T. W. Laver, A. T. Hattersley, T. M. Frayling, and M. N. Weedon, “PLIN1 Haploinsufficiency Causes a Favorable Metabolic Profile,” Journal of

Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 107, no. 6, 2022, doi: 10.1210/clinem/dgac104.

[11] N. Bonello-Palot et al., “High prevalence of mutations in perilipin 1 in patients with precocious acute coronary syndrome,” Atherosclerosis, vol. 293, 2020, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.12.002.

[12] L. B. De Azevedo Medeiros et al., “High prevalence of Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in Rio Grande do Norte State, Northeast Brazil,” DiabetolMetab Syndr, vol. 9, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s13098-017-0280-7.

[13] Lefter M et al. (2021). Mutalyzer 2: Next Generation HGVS Nomenclature Checker. Bioinformatics, 2021 Sep 15; 37(28):2811-7

[14] Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitg M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF, Notredame C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(Web Server issue):W13-7. doi: 10.1093/nar/gkr245. Epub 2011 May 9. PMID: 21558174; PMCID: PMC3125728.

[15] UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, Ferrin TE. Protein Sci. 2023 Nov;32(11):e4792.

[16] ColabFold: making protein folding accessible to all. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. Nat Methods. 2022 Jun;19(6):679-682.

[17] Desgrouas C, Thalheim T, Cerino M, Badens C, Bonello-Palot N. Perilipin 1: a systematic review on its functions on lipid metabolism and atherosclerosis in mice and humans. Cardiovasc Res. 2024 Mar 14;120(3):237-248. doi: 10.1093/cvr/cvae005. PMID: 38214891.

[18] Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ,Jenkins NA, Londos C and Kimmel AR (2001) Themurine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splicevariants and define a gene family of ancient origin

[19] Zhang HH, Souza SC, Muliro KV, Kraemer FB, Obin MS, Greenberg AS. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. J Biol Chem 2003;278:51535–5154

[20] Kozusko K, Tsang V, Bottomley W, Cho YH, Gandotra S, Mimmack ML, Lim K, Isaac I, Patel S, Saudek V, O'Rahilly S, Srinivasan S, Greenfield JR, Barroso I, Campbell LV, Savage DB. Clinical and molecular characterization of a novel PLIN1 frameshift mutation identified in patients with familial partial lipodystrophy. Diabetes. 2015 Jan;64(1):299-310. doi: 10.2337/db14-0104. Epub 2014 Aug 11. PMID: 25114292; PMCID: PMC4361744.

Anexos



Figura 1. PLIN1 p.Val398Glyfs166 predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX.



Figura 2. PLIN1 Pro403fs164 predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX.



Figura 3. PLIN1 Y401Lfs105 predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX.



Figura 4. PLIN1 Pro439Valfs125 predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX.



Figura 5. PLIN1 selvagem predita pelo AlphaFold e visualizada pelo ChimeraX.



Figura 6. Alinhamento do segmento C-terminal de 4 variantes de PLIN1 mutadas e PLIN1 selvagem (PLIN1WT).

CÓDIGO: SB0661

AUTOR: MARÍLIA RANGEL FERNANDES

ORIENTADOR: ADRIANO CALIMAN FERREIRA DA SILVA

TÍTULO: Impacto de Painéis Solares Fotovoltaicos na Variabilidade Térmica Diária de Ecossistemas Aquáticos: A importância da extensão da cobertura, do estado trófico, do período do dia e da sazonalidade.

Resumo

Sistemas Fotovoltaicos Flutuantes (FPVs) crescem rapidamente por economizarem espaço em terra e superarem os sistemas terrestres em eficiência. No entanto, seus impactos ecológicos permanecem pouco compreendidos. Ao bloquear a radiação solar direta, essas instalações alteram a dinâmica térmica dos sistemas aquáticos, incluindo a variabilidade térmica diária (VTD) da água, cujas flutuações são fundamentais para a dinâmica ecológica. Este estudo investigou os efeitos da cobertura por FPV (0%, 25%, 45% e 65%), do período (dia/noite) e da sazonalidade na VTD por meio de um experimento em mesocosmos (Moulis, França; maio/2023 a setembro/2025). A cobertura e o período apresentaram efeitos individuais e interativos significativos na VTD. A cobertura por FPV diminuiu a VTD, com impactos mais pronunciados durante o dia e no verão. Nas coberturas de 25%, 45% e 65%, a estabilização da VTD diurna aumentou ~15%, 25% e 55%, contra 8%, 15% e 40% à noite. O nível de 65% reduziu a VTD desproporcionalmente, indicando uma relação não linear entre a cobertura e a dinâmica térmica. Essas alterações podem mudar os processos de estratificação, afetando o funcionamento ecológico, a ciclagem de nutrientes e a fauna local. O estudo demonstra que coberturas extensas podem desacoplar os corpos d'água de seus ciclos naturais de aquecimento diário de forma não estática (mais intensa no verão). Assim, é crucial identificar limiares críticos para que os FPVs não comprometam a funcionalidade dos ecossistemas

Palavras-chave: FPV; variabilidade térmica; energia renovável.

TITLE: Impact of Photovoltaic Solar Panels on the Daily Thermal Variability of Aquatic Ecosystems: The importance of coverage extent, trophic state, time of day, and seasonality.

Abstract

Floating Photovoltaic Systems (FPVs) are growing rapidly by saving land space and outperforming land-based systems in efficiency. However, their ecological impacts remain poorly understood. By blocking direct solar radiation, these installations alter the thermal dynamics of aquatic systems, including daily thermal variability (DTV) of water, whose fluctuations are fundamental to ecological dynamics.This study investigated the effects of FPV coverage (0%, 25%, 45%, and 65%), time of day (day/night), and seasonality on DTV through a mesocosm experiment (Moulis, France; May/2023 to September/2025). Coverage and time of day showed significant individual and interactive effects on DTV. FPV coverage decreased DTV, with impacts more pronounced during the day and in summer. At 25%, 45%, and 65% coverage, daytime DTV stabilization increased by ~15%, 25%, and 55%, compared to 8%, 15%, and 40% at night. The 65% level reduced DTV disproportionately, indicating a non-linear relationship between coverage and thermal dynamics.These changes can alter stratification processes, affecting ecological functioning, nutrient cycling, and local fauna. The study demonstrates that extensive coverage can fundamentally decouple water bodies from their natural daily warming cycles in a non-static way (more intense in summer). Thus, identifying critical thresholds is essential so FPVs do not compromise ecosystem stability.

Keywords: FPV; thermal variability; renewable energy.

Introdução

O uso de energia não renovável no Brasil e no mundo permanece contínuo, impondo sérios riscos à sustentabilidade devido ao esgotamento progressivo dos recursos e à combustão de combustíveis fósseis (como carvão, óleo e gás), que libera uma grande quantidade de dióxido de carbono (CO2) e contribui para as mudanças climáticas (Žarković et al., 2022). A gestão inadequada dos recursos pode levar ao colapso industrial e, por isso, as energias renováveis tornaram-se uma área prioritária para implementação (Žarković et al., 2022). A energia solar surge como alternativa renovável promissora para reduzir os custos de eletricidade (Costa et al., 2020). Contudo, sistemas fotovoltaicos (PV) terrestres intensificam o uso do solo, impactando sua qualidade, a água e a biodiversidade local (Cogato, Marinello, & Pezzuolo, 2023). Nesse sentido, a implementação de painéis flutuantes em corpos d'água (FPVs) tem se mostrado viável, sobretudo em reservatórios hidrelétricos, pois o sombreamento reduz a evaporação, aumenta o resfriamento e otimiza a geração energética (Kakoulaki et al., 2022). Tais sistemas não ocupam áreas terrestres, acumulam menos poeira e possuem limpeza facilitada, gerando maior eficiência geral (Yang et al., 2022).

Apesar dos benefícios, os impactos ambientais dos FPVs nos ecossistemas aquáticos exigem atenção. O bloqueio físico de luz e vento pelos painéis altera a produção primária, o metabolismo das espécies e a dinâmica fenológica dos organismos (Nobre et al., 2025). A temperatura é outro critério essencial: seus efeitos dependem da morfometria do corpo d'água, clima, temperatura do ar e extensão da cobertura dos painéis (Nobre et al., 2025).

No Lago Kremasta (Grécia), 0,9% de cobertura por FPV não alterou significativamente o oxigênio ou nutrientes, mas reduziu a temperatura em 3,2% sob os painéis e 2,2% nas proximidades (Mentzafou et al., 2025). Em lagos menores — onde a cobertura na Ásia e Europa chega a 50% —, esses efeitos térmicos podem se espalhar por toda a superfície aquática (Nobre et al., 2022, 2025).

Os FPVs também alteram a temperatura diária ao modificar a incidência da radiação solar sobre a água. Lagos menores que 3km2 chegam a variar de 4 a 7ºC em um único dia (Woolway et al., 2016). O aquecimento diurno estabiliza a coluna d'água e o resfriamento noturno promove a mistura vertical, essencial à oxigenação (Martinsen et al., 2019). A variabilidade térmica diária difere conforme o período do dia (presença ou ausência de luz solar), as variações ao longo das horas do dia e a angulação do sol em relação à água, principal reguladora da irradiância em escala diária e sazonal (Rose, 2024).

Sazonalmente, a posição solar e o fotoperíodo (o total de horas do dia com luz disponível) impactam o comportamento térmico da coluna d'água. Na França, o solstício de verão de 2025 teve cerca de 16 horas do dia com luz solar e 8 horas de escuridão, relação que se inverte no solstício de inverno (IMCCE, 2025). Assim, o ciclo anual de aquecimento e resfriamento depende da incidência, da sazonalidade e da duração da radiação nas diferentes estações do ano (Jones & Smol, 2024). Além disso, o estado trófico influencia essa dinâmica: ecossistemas eutróficos concentram calor na superfície por autossombreamento algal, enquanto lagos oligotróficos, mais transparentes, permitem maior penetração do calor (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2012).

Portanto, é fundamental avaliar os FPVs na variabilidade térmica da água considerando o estado trófico, as porcentagens de cobertura, os períodos do dia, as alterações contínuas nas horas do dia e os efeitos da sazonalidade, prevenindo impactos à sustentabilidade dos ecossistemas (Nobre et al., 2022). O objetivo deste trabalho é investigar os efeitos de diferentes coberturas por FPV na variabilidade térmica diária da água, analisando o estado trófico, o período do dia, o comportamento ao longo das horas do dia e a influência da sazonalidade e suas interações.

Metodologia

Delineamento experimental

O experimento em mesocosmos foi conduzido entre 16 de maio de 2023, correspondendo à instalação dos painéis FPV, e 11 de setembro de 2025. O experimento foi realizado no Aquatic Metatron, uma plataforma experimental localizada em Moulis, França (42°57'N, 1°05'E; Richard et al., 2025).

Tanques cilíndricos (1,70 m de diâmetro, 0,60 m de profundidade, 1100 L) foram utilizados como mesocosmos. Em junho de 2022, cada tanque foi preenchido com água filtrada de um riacho próximo (o Rio Lèze) e recebeu uma camada de 5 cm de areia e cascalho no fundo. No início de julho de 2022, os mesocosmos foram inoculados com fitoplâncton, perifíton, zooplâncton e macroinvertebrados (Corbiculidae, Ephemeridae,

Heteroptera, Odonata, Asellidae e Trichoptera) coletados de rios e lagos de cascalheira próximos (o Rio Le Touch, a confluência dos rios Garonne e Ariège e cascalheiras localizadas em Martres Tolosane [43,20° N, 1,04° E] e Cintegabelle [43,30° N, 1,53° E]).

O delineamento experimental combinou quatro níveis de cobertura por FPV (0%, 25%, 45%, 65%), refletindo a amplitude global observada em instalações operacionais de FPV (mediana de 37,5%, Xia et al., 2023; média de 34,2% ± 22 DP, Nobre et al., 2024), e dois níveis de nutrientes (mesocosmos enriquecidos com nutrientes e não enriquecidos) Cada combinação foi replicada quatro vezes, resultando em 32 mesocosmos distribuídos segundo um delineamento em blocos (Figura 1).

Antes da instalação dos FPVs, metade dos mesocosmos recebeu adição de nutrientes (tratamentos enriquecidos), resultando em maiores concentrações de nutrientes, clorofila-a e turbidez no início do experimento (dados não publicados). Os quatro níveis de cobertura por FPV foram obtidos cortando painéis fotovoltaicos defeituosos de usinas FPV existentes. Estes foram montados sobre flutuadores de PEAD, o mesmo polímero utilizado em sistemas operacionais (Essak & Ghosh, 2022; Sahu et al., 2016).

Monitoramento da temperatura nos mesocosmos

A temperatura da água (°C) foi monitorada usando registradores de temperatura HOBO UA-001-64 (HOBO; Onset, EUA; resolução de 0,14 °C a 25 °C, precisão de ±0,5 °C, intervalos de 30 minutos) colocados no fundo de cada mesocosmo dentro de tubos de PVC para evitar a radiação solar direta. Os dados de dois registradores foram excluídos devido a valores discrepantes (outliers), provavelmente oriundos de erros de calibração ou exposição ao sol. As temperaturas médias diárias (WT) e a variabilidade nictemeral na temperatura da água (coeficiente de variação, CVWT) foram calculadas para cada mesocosmo.

Análise estatística

A temperatura foi registrada em intervalos de 30 minutos em cada mesocosmo ao longo de aproximadamente dois anos. Para cada mesocosmo e dia de amostragem, a variabilidade térmica diária foi quantificada como o coeficiente de variação (CV%) calculado separadamente para os períodos diurno e noturno:

$$CV_{d,m,p,t} = (\sigma_{d,m,p,t} / \mu_{d,m,p,t}) \times 100$$

onde $\sigma_{d,m,p}$ e $\mu_{d,m,p}$ representam o desvio padrão e a temperatura média, respectivamente, registrados no dia d, mesocosmo m, período p (diurno ou noturno) e estado trófico t (eutrófico ou oligotrófico).

Para quantificar a magnitude dos efeitos dos tratamentos ao longo do tempo, conduzimos uma análise baseada nos tamanhos de efeito diários (daily effect sizes). Para cada dia de amostragem d, período p, nível de cobertura c, e estado trófico t, calculamos primeiro o CV médio entre os mesocosmos de cada tratamento. O tamanho do efeito (Effect Size) foi então calculado em relação ao controle de 0% de cobertura como:

$$ES_{d,p,c,t} = ((\bar{CV}_{d,p,t,0} - \bar{CV}_{d,p,t,c}) / \bar{CV}_{d,p,t,0}) \times 100$$

onde $C\bar{V}_{d,p,t,0}$ representa o CV médio diário no controle (0% de cobertura). Sob essa formulação, valores positivos indicam reduções na variabilidade térmica em relação ao controle (isto é, maior estabilidade térmica), enquanto valores negativos indicam aumentos na variabilidade térmica (menor estabilidade). Essa definição direcional permite que os tamanhos de efeito sejam interpretados diretamente em termos de efeitos estabilizadores versus desestabilizadores dos tratamentos.

Assim, para analisar os efeitos da cobertura por FPV sobre a variabilidade térmica diária e verificar se há uma dependência em relação ao estado trófico e à dinâmica do ciclo diário de temperatura, foram utilizados modelos aditivos generalizados (GAM) separadamente para os períodos de dia e da noite.

O Effect Size do CV foi incluído como variável resposta, enquanto a cobertura por fotovoltaicos flutuantes (FPV; 0%, 25%, 45% e 65%); o período do dia (dia versus noite); e o estado trófico (eutrófico e oligotrófico) foram efeitos fixos. Os mesocosmos foram introduzidos como efeitos aleatórios, a fim de acomodar a auto-correlação intrínseca entre eles. A variável que representa a relação entre o período diurno e noturno (day:night ratio) foi incluída como termo suavizador, permitindo representar relações não lineares. O efeito desse gradiente foi estimado separadamente para cada combinação de cobertura de FPV e estado trófico. Além disso, a data foi incluída como efeito aleatório para controlar a variação temporal comum às unidades experimentais. A adequação dos modelos foi avaliada por meio da inspeção dos resíduos, incluindo sua distribuição, normalidade e relação entre valores ajustados e resíduos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no R.

Resultados e Discussões

Figura 2: Influência dos níveis de cobertura por FPV, estado trófico do mesocosmo e hora do dia no coeficiente de variação (CV) da temperatura diária.

Os resultados sugerem de forma não linear que porcentagens mais altas de cobertura por FPV nos mesocosmos correspondem a uma menor variabilidade térmica diária no corpo d'água. Graficamente, há maior variação de temperatura durante o dia, impulsionada diretamente pela radiação solar na superfície, ao passo que o comportamento oposto é observado à noite.

Figura 3: Efeito previsto na variabilidade térmica diária considerando os níveis de cobertura por FPV, estado trófico do mesocosmo, hora do dia e razão dia:noite.

Complementando o resultado anterior, infere-se que, à medida que os níveis de cobertura aumentam, a variação diária de temperatura diminui. Durante o dia, em mesocosmos oligotróficos, a redução na variabilidade ultrapassa 60% em relação ao controle na cobertura de 65% FPV (o GAM explicou 44% da variação diurna e 33% da variação noturna, respectivamente).

Ressalta-se que essa análise não se baseou nas temperaturas médias brutas, mas sim nas suas flutuações (CV) ao longo do tempo — especificamente entre o dia e a noite para cada data. Assim, o que se observa aqui são mudanças nos padrões de aquecimento e resfriamento dos mesocosmos em diferentes contextos e escalas.

Esses resultados sugerem que os painéis solares flutuantes podem induzir mudanças significativas na variabilidade térmica diária dos ecossistemas aquáticos. A diminuição do CV diário reforça a hipótese de que, durante o dia, a presença dos painéis faz com que a água esquente menos e, durante a noite, perca menos calor, podendo reduzir a taxa de evaporação (Nobre et al., 2023). Essas modificações dependem de vários fatores, incluindo aqueles testados neste experimento, bem como parâmetros relacionados aos padrões geográficos locais no local de instalação, padrões de vento, precipitação, entre outros (Nobre et al., 2025).

Durante o dia, devido à radiação solar direta nos mesocosmos, ocorreu uma maior divergência entre os níveis de variação térmica e estabilidade; ou seja, os efeitos de diferentes porcentagens de cobertura de painéis foram atenuados sob esse cenário. Assim, o primeiro fator físico a ser explorado é o sombreamento que os painéis causam nas superfícies aquáticas, diminuindo a entrada de calor e radiação — e consequentemente a quantidade de energia presente no ecossistema —, o que contribui para o amortecimento (buffering) da variação diária de temperatura. Isso se torna ainda mais evidente ao comparar mesocosmos oligotróficos e eutróficos. Uma explicação possível para esse fenômeno reside nas diferentes taxas de aquecimento e resfriamento de corpos d'água em distintos níveis tróficos. A alta biomassa fitoplanctônica em sistemas eutróficos aumenta a absorção de luz na superfície, gerando um forte efeito de auto sombreamento. Isso limita a penetração da energia solar para camadas mais profundas, aprisionando o calor na camada superior da coluna d'água e alterando significativamente a estrutura térmica e a dinâmica de mistura em comparação com águas mais transparentes e oligotróficas (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2012).

O segundo fator físico que interfere na temperatura da água é o vento. A presença dos painéis na superfície causa um bloqueio mecânico que interfere na influência desse parâmetro no resfriamento e na estrutura da coluna d'água. Segundo a literatura, os processos de refração e reflexão da luz dependem do estado da superfície (calma ou com movimentos induzidos pela ação do vento) (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2012). Assim, modificações na intensidade da influência desse parâmetro podem causar mudanças na distribuição e penetração da radiação solar dentro da coluna d'água. Apesar de o experimento ser limitado quanto à profundidade do mesocosmo, impedindo uma análise aprofundada sobre a formação da estratificação térmica, acredita-se que tanto o sombreamento quanto o bloqueio de vento causam alterações na absorção e distribuição de calor. Além disso, na ausência de um agente que induz a mistura vertical, as trocas gasosas podem ficar limitadas apenas à superfície, dificultando a oxigenação das camadas mais profundas (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2012).. Consequentemente, importantes alterações biológicas relacionadas às modificações de temperatura diária em ambientes aquáticos podem ocorrer.

Nessa análise, para além de considerar a variação a nível diário, também observa-se o comportamento térmico de acordo com a sazonalidade. Nota-se que, durante o verão, houve uma tendência a diminuir o efeito de buffering dos painéis sob a superfície aquática, ou seja, a estabilidade térmica diminuiu em comparação ao inverno. Na França,

onde o experimento foi conduzido, as estações do ano são bem demarcadas e as horas de exposição à luz solar mudam consideravelmente ao longo do ano. Em 2025, o solstício de verão obteve aproximadamente 16 horas de luz solar e 8 horas de escuridão, enquanto no solstício de inverno esta relação se inverte (IMCCE, 2025).

Assim, infere-se que os efeitos dos FPVs na temperatura aquática dos mesocosmos modificam-se tanto a nível diário, com a ausência, presença e as diferentes angulações do sol em relação à superfície, como também a nível sazonal, onde a quantidade de horas de luz solar cresce do inverno até o verão.

Conclusão

A presença de FPV reduziu a variabilidade térmica diária, com efeitos mais pronunciados durante o dia em comparação com a noite e em porcentagens de cobertura maiores. Sistemas oligotróficos demonstraram ser mais afetados em relação aos eutróficos, e a sazonalidade se mostrou um fator importante no comportamento térmico das superfícies aquáticas. Mudanças na variabilidade podem afetar dinâmicas térmicas dos ecossistemas de água doce, como a estratificação. A implementação dessa tecnologia pode ter consequências ecológicas por desacoplar o sistema de seu ciclo natural de aquecimento e resfriamento, sendo importante que estudos que avaliem os potenciais riscos dessa implementação e que investiguem maneiras de torná-la o mais sustentável possível.

Referências

Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H. & White, J.S.S. (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. Trends in Ecology & Evolution, 24, 127–135.

Cogato, A., Marinello, F., & Pezzuolo, A. (2023). Soil footprint and land-use change to clean energy production: Implications for solar and wind power plants. Land, 12(10), 1822.https://doi.org/10.3390/land12101822

Costa, A. C., Oliveira, D. F., Rabelo, M. H., Bravo, M. D. S. L., & Piazzarolo, J. (2020). Energia solar fotovoltaica é uma alternativa viável? Brazilian Journal of Development, 6(9), 72637–72656.https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-001

Holm, S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scandinavian Journal of Statistics, 6, 65–70.

Hurlbert, S.H. (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. Ecological Monographs, 54, 187–211.

INSTITUT DE MÉCANIQUE CÉLESTE ET DE CALCUL DES ÉPHÉMÉRIDES (IMCCE). Éphémérides - Formulaires: Visibilité des corps célestes. Paris: Observatoire de Paris, 2025. Disponível em: <https://ssp.imcce.fr/forms/visibility>. Acesso em: 27 ago. 2026.

Jandaghi, Z., & Colombo, A. (2024). The role of water bodies in climate regulation: Insights from recent studies on urban heat island mitigation. Buildings, 14(9), 2945.https://doi.org/10.3390/buildings14092945

Kakoulaki, G., Gonzalez Sanchez, M. R., Gracia Amillo, A., Szabo, S., De Felice, M., Farinosi, F., De Felice, L., Bisselink, B., Seliger, R., Kougias, I., & Jaeger-Waldau, A. (2022). Benefits of pairing floating solar photovoltaics with hydropower reservoirs in Europe. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 171, 112989.https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112989

Martinsen, K. T., Andersen, M. R., & Sand-Jensen, K. (2019). Water temperature dynamics and the prevalence of daytime stratification in small temperate shallow lakes. Hydrobiologia, 826, 247–262.https://doi.org/10.1007/s10750-018-3737-2

Mentzafou, A., Dimitriou, E., Karaouzas, I., & Zogaris, S. (2025). Impact assessment of floating photovoltaic systems on the water quality of Kremasta Lake, Greece. Hydrology, 12(4), 92.https://doi.org/10.3390/hydrology12040092

Nobre, R., Boulêtreau, S., & Cucherousset, J. (2022, 12 de julho). Small lakes at risk from extensive solar-panel coverage [Correspondence]. Nature, 607(7918), 239.https://doi.org/10.1038/d41586-022-01891-w

NOBRE, Regina et al. Potential ecological impacts of floating photovoltaics on lake biodiversity and ecosystem functioning. Renewable and Sustainable Energy Reviews, [s. l.], v. 188, p. 113852, Dec. 2023. DOI:https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113852.

Nobre, R. L. G., et al. (2025). Floating photovoltaics strongly reduce water temperature: A whole-lake experiment. Journal of Environmental Management, 375, 124230.https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2025.124230

Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. (2000) Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer, New York.

Quinn, G.P. & Keough, M.J. (2002) Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press, Cambridge.

ROSE, Kevin C. Light in Inland Waters. In: JONES, Ian D.; SMOL, John P. (Eds.). Wetzel's Limnology: lake and river ecosystems. 4. ed. London: Academic Press, 2024. cap. 6, p. 75-94.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Limnology. Boca Raton: CRC Press, 2012. 888 p.

Underwood, A.J. (1997) Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance. Cambridge University Press, Cambridge.

Yang, P., Chua, L. H. C., Irvine, K. N., Nguyen, M. T., & Low, E.-W. (2022). Impacts of a floating photovoltaic system on temperature and water quality in a shallow tropical reservoir. Limnology, 23, 441–454.https://doi.org/10.1007/s10201-022-00698-y

Žarković, M., Lakić, S., Ćetković, J., Pejović, B., Redzepagić, S., Vodenska, I., & Vujadinović, R. (2022). Effects of renewable and non-renewable energy consumption, GHG, ICT on sustainable economic growth: Evidence from old and new EU countries. Sustainability, 14(15), 9662.https://doi.org/10.3390/su14159662

Anexos



figura 1



figura 2



figura 3

CÓDIGO: SB0666

AUTOR: MARIA ELISA FILGUEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: IURI GOULART BASEIA

TÍTULO: Diversidade de Geastrum para o semiárido e Mata Atlântica no Nordeste Brasileiro

Resumo

O gênero Geastrum Pers. (Geastraceae, Basidiomycota), conhecido como “estrelas-da-terra”, compreende fungos macroscópicos predominantemente sapróbios, com reconhecida importância ecológica e potencial biotecnológico. A região Nordeste do Brasil concentra uma parcela expressiva da diversidade conhecida do gênero, embora ainda existam lacunas relacionadas à sua distribuição e caracterização taxonômica.Este estudo teve como objetivo inventariar e descrever espécies de Geastrum a partir de espécimes coletados na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba. A identificação foi realizada com base em caracteres macro e micromorfológicos, seguindo metodologias consolidadas para o grupo.Foram reconhecidas cinco espécies, designadas como Geastrum cf javanicum, Geastrum aff. echinulatum, Geastrum aff. setiferum, Geastrum cf. ovalisporum e Geastrum saccatum, todas incorporadas à coleção UFRN-Fungos. Os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre a ocorrência dessas espécies no Nordeste brasileiro e reforçam a importância de levantamentos taxonômicos contínuos, especialmente em áreas de Mata Atlântica e formações associadas ao semiárido, contribuindo para a compreensão e conservação da diversidade fúngica regional.

Palavras-chave: Fungos gasteroides; Sistemática fúngica; Micodiversidade; Taxonomia.

TITLE: Diversity of the genus Geastrum Pers. (Basidiomycota) in semi-arid and Atlantic Forest regions of the Brazilian Northeast

Abstract

The genus Geastrum Pers. (Geastraceae, Basidiomycota), popularly known as "earthstars," comprises saprobic or mycorrhizal macroscropic fungi of ecological and pharmacological relevance. The Brazilian Northeast records approximately 29% of the globally known species, yet much remains to be discovered and studied. This study aimed to inventory and taxonomically describe species of Geastrum from collections in the Guaribas Biological Reserve, Paraíba. Specimens were analyzed using macro- and

micromorphological characteristics following standardized protocols. As a result, X species were identified: Geastrum1, 2, 3 (...), all deposited in the UFRN-Fungos collection. These records expand the known distribution of these species in the Northeast region and emphasize the need for continuous collection efforts and revision of collections to better understand and conserve fungal biodiversity in remnants of the Atlantic Forest and Caatinga.

Keywords: Gasteroid fungi; Taxonomy; Diversity; Atlantic Forest; Semi-arid

Introdução

O gênero Geastrum Pers., descrito por Persoon em 1801, pertence à família Geastraceae (Basidiomycota) e é popularmente conhecido como “estrela-da-terra”, em razão da abertura do exoperídio em raios durante o desenvolvimento do basidioma (Soto & Wright, 2000). Trata-se de um grupo de fungos gasteroides de distribuição cosmopolita, registrado em todos os continentes, exceto a Antártida (Sunhede, 1989), atuando principalmente como decompositores da matéria orgânica em diferentes ecossistemas, tanto tropicais quanto temperados (Douanla-Meli et al., 2005; Kasuya et al., 2011). Algumas espécies apresentam potencial biotecnológico e farmacológico, além de capacidade de estabelecer relações ectomicorrízicas com plantas (Freitas-Neto, 2021).

A diversidade global de Geastrum é estimada em 144 espécies (Wang & Bau, 2023; Zhang et al., 2023; Yang et al., 2025). Entretanto, revisões taxonômicas e estudos filogenéticos multilocus indicam que a diversidade do gênero ainda pode estar subestimada, especialmente em regiões tropicais (Yang et al., 2025; Araújo et al., 2026). No Brasil, são reconhecidas aproximadamente 76 espécies (Crous et al., 2023; Freitas et al., 2023; Freitas-Neto et al., 2023), enquanto o Nordeste apresenta 42 espécies registradas (Pires et al., 2023; Freitas et al., 2025), incluindo Geastrum argentum, descrito para a Mata Atlântica nordestina (Freitas et al., 2025).

O aumento de espécies descritas para o Brasil nas últimas décadas evidencia o avanço do conhecimento taxonômico, com destaque para G. laevisporum, G. magnosporum e G. pusillipilosum (Crous et al., 2016, 2018), G. caririense (Crous et al., 2017) e G. verrucoramulosum (Cabral et al., 2017), além de outros táxons descritos posteriormente (Accioly et al., 2019; Freitas-Neto, 2023; Crous et al., 2023). Apesar desses avanços, a distribuição das espécies permanece heterogênea e marcada por lacunas amostrais entre biomas e fitofisionomias.

Na região Nordeste, Sousa et al. (2014) registraram G. minimum Schwein. pela primeira vez para a região. Posteriormente, Pires et al. (2023) contabilizaram 41 espécies, incluindo novas ocorrências na Mata Atlântica baiana, e Freitas et al. (2025) elevaram esse número para 42 espécies. Ainda assim, esses dados podem estar subestimados diante da extensão territorial e da diversidade ambiental regional.

A Mata Atlântica é reconhecida como hotspot global de biodiversidade, com elevados níveis de endemismo e intensa pressão antrópica (Myers et al., 2000), reforçando a necessidade de inventários que incluam fungos gasteroides. O semiárido nordestino,

historicamente subamostrado em estudos micológicos, também se mostra promissor para a ocorrência de Geastrum, especialmente durante períodos chuvosos, quando há condições favoráveis à frutificação. Ambientes secos e sazonalmente estressantes podem abrigar linhagens adaptadas e potencialmente endêmicas, cuja diversidade permanece pouco documentada (Baseia et al., 2014; Sousa et al., 2015). A elevada heterogeneidade entre Mata Atlântica e semiárido reforça a importância de estudos comparativos entre diferentes fitofisionomias.

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade e distribuição de Geastrum no Nordeste do Brasil, por meio da análise de espécimes coletados na Reserva Biológica Guaribas (PB). O trabalho busca preencher lacunas taxonômicas, fortalecer coleções científicas regionais e fornecer subsídios para futuras pesquisas ecológicas, filogenéticas e conservacionistas.

Metodologia

Os espécimes analisados neste estudo foram obtidos a partir de coletas realizadas durante o período chuvoso de 2024 (julho), na Reserva Biológica Guaribas (REBIO Guaribas), localizada no município de Mamanguape, Paraíba. Os procedimentos de coleta seguiram protocolos estabelecidos para fungos gasteroides (Silva et al., 2014). Após a coleta, o material foi desidratado e armazenado em recipientes herméticos, sendo posteriormente destinado às análises laboratoriais e incorporação à coleção UFRN-Fungos.As análises foram conduzidas no Laboratório de Biologia de Fungos (LBF), vinculado ao Departamento de Botânica e Zoologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), utilizando abordagens clássicas aplicadas à taxonomia de Geastraceae (Sunhede, 1989; Baseia et al., 2014; Zamora et al., 2014; Sousa, 2015).

A caracterização macromorfológica dos basidiomas foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica, considerando atributos como forma, dimensões, coloração, textura da superfície, forma ápice, número de raios e presença de estruturas associadas, como rizomorfas e subículo. Também foram avaliadas as características das camadas micelial, fibrosa e pseudoparenquimatosa do perídio. As medições foram obtidas com paquímetro digital, e a determinação das cores baseou-se na tabela de Kornerup & Wanscher (1978).

Para a análise microscópica, fragmentos da região fértil dos basidiomas foram removidos com auxílio de pinças e montados em lâminas histológicas. As preparações foram realizadas em solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 5% e examinadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ni, equipado com câmera Nikon DS-Ri1 para registro de imagens. Para cada espécime foram realizadas 30 medições de esporos e elementos do capilício, com auxílio do software NIS-Elements AR v.4.51.00. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo de média, desvio padrão e razão entre comprimento e largura (Qm).

A identificação dos espécimes baseou-se na comparação com descrições disponíveis na literatura especializada (Zamora et al., 2013; Sousa et al., 2015; Accioly et al., 2019).

Após a determinação taxonômica, o material foi catalogado e incorporado à coleção UFRN-Fungos, seguindo a terminologia padronizada proposta por Kirk et al. (2008).

Adicionalmente, durante o primeiro semestre de 2025, foram realizadas novas coletas em diferentes unidades de conservação, incluindo a Floresta Nacional de Nísia Floresta (RN), o Parque Estadual das Dunas de Natal (RN) e o Parque Estadual Mata do Pau-Ferro (PB). Nessas áreas, foram percorridas trilhas pré-existentes e, quando necessário, realizadas incursões fora dessas rotas, com o objetivo de ampliar a cobertura amostral. Os espécimes foram documentados fotograficamente em campo, com registro da localização, e coletados manualmente ou com auxílio de instrumentos de corte, sempre acompanhados de parte do substrato, especialmente em casos de espécies associadas a estruturas como rizomorfas e subículo (Fidalgo & Bononi, 1984). Esses materiais encontram-se em processamento e seguirão os mesmos procedimentos analíticos descritos anteriormente, sendo posteriormente incorporados à coleção UFRN-Fungos.

Resultados e Discussões

Foram analisados 47 basidiomas, dentre eles 5 espécies: Geastrum cf javanicum Lév , Geastrum aff. echinulatum T.S. Cabral, B.D.B. Silva & Baseia, Geastrum aff. setiferum Baseia , Geastrum cf. ovalisporum Calonge e Mor.-Arr. e Geastrum saccatum Fr.

Taxonomia

Geastrum cf. javanicum Lév

Etimologia: Em referência ao aspecto fortemente desidratado e escurecido do basidioma, lembrando superfície “gratinada”.

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, amarelo-amarronzado, subgloboso a irregular, aproximadamente 6,5–8,2 mm de altura × 15,9–16,9 mm de largura, ápice arredondado, superfície cotonosa a tomentosa, livre de incrustações evidentes, com rizomorfa aderida, encontrado sobre substrato arenoso. Basidioma expandido saculiforme a arqueado, aproximadamente 13,9–14,7 mm de altura × 14,7 mm de largura (incluindo peristômio). Exoperídio aberto formando aproximadamente 6 raios, arqueados a parcialmente revolutos; higroscopia não determinada. Camada micelial branco-amarelada, superfície cotonosa a tomentosa, persistente, formando tomentos semelhantes aos observados no basidioma imaturo. Camada fibrosa com coloração não determinada. Camada pseudoparenquimatosa marrom-escura, persistência não determinada. Endoperídio marrom-acinzentado a marrom-escuro, subgloboso a depresso-globoso, aproximadamente 4–7 mm de altura × 5–8 mm de largura, séssil ou subséssil. Apófise não observada. Pedicelo não observado. Peristômio não observado com nitidez suficiente para caracterização quanto ao tipo, delimitação ou forma. Gleba marrom-escura.

Basidiosporos amarronzados, globosos a subglobosos, 2,87–3,82 × 3,03–3,80 µm [x = 3,31 ± 0,27 × 3,47 ± 0,24; Qm = 1,05; n = 30]. Ornamentação evidente em MOP;

morfologia detalhada das verrugas não determinadas. Eucapilícios amarelados a castanho-claros, de paredes retas a levemente sinuosas, 2,44–3,81 µm diam., parede 0,95–1,59 µm, superfície não determinada, lúmen aparente, ramificações não determinadas. Camada micelial composta por hifas hialinas a amareladas, 3,59–6,76 µm diam., parede 1,34–2,81 µm, superfície não determinada, lúmen evidente, ramificações não determinadas. Camada fibrosa formada por hifas hialinas a amareladas, 3,87–6,98 µm diam., parede 1,18–2,56 µm, superfície não determinada, lúmen evidente. Camada pseudoparenquimatosa composta por células subglobosas a ovaladas, 18,29–37,97 × 15,09–33,99 µm.

Rizomorfa presente, aderida ao substrato; demais características não determinadas.

Habitat: Substrato arenoso associado à liteira (necessita confirmação adicional).

Hábito: Gregário.

Material examinado: Paraíba, Reserva Biológica Guaribas – Rio Tinto, 06/2026.

Distribuição: Não determinada.

Observações: O material encontra-se fortemente desidratado, dificultando observações adicionais sobre superfície do endoperídio, tipo de peristômio e higroscopia. O espécime apresenta camada micelial persistente formando tomentos e rizomorfa aderida ao substrato arenoso, características que aproximam o material de espécies como Geastrum javanicum e G. lloydianum Rick, embora a ausência de observações seguras do peristômio impeça identificação específica. Caracteres relacionados à ornamentação detalhada dos basidiosporos e ultraestrutura das hifas necessitam de observações complementares.

Geastrum aff. echinulatumT.S. Cabral, B.D.B. Silva & Baseia

Etimologia: Em referência ao aspecto manchado do exoperídio, apresentando áreas claras contrastando com áreas escuras.

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, amarelo-amarronzado a marrom-amarelado (5D5), subgloboso a piriforme, 18,1–26,8 mm de altura × 19,6–29,1 mm de largura, ápice arredondado, superfície hirsuta a cotonosa, livre de incrustações aparentes, com rizomorfa aderida, crescendo sobre subículo cinza-claro a amarelado. Basidioma expandido saculiforme, 14,1–22,1 mm de altura × 18–22,5 mm de largura (incluindo peristômio). Exoperídio aberto formando 5–6 raios, arqueados a revolutos, recurvados abaixo do basidioma, não higroscópicos. Camada micelial amarelo-amarronzada (5D5), formando equínulos, persistente, livre de incrustações aparentes. Camada fibrosa papirácea marrom-amarelada. Camada pseudoparenquimatosa marrom-acinzentada (7F3), persistente. Endoperídio marrom-acinzentado (6F3), subgloboso, 12,9–22 mm de altura × 14,4–21,7 mm largura, séssil, superfície pruinosa. Apófise ausente. Pedicelo ausente. Peristômio fibriloso, não delimitado, cônico, aproximadamente 0,9 mm de altura, mais escuro que o endoperídio. Gleba marrom-escura.

Basidiosporos amarronzados, globosos a subglobosos, 3,14–3,82 × 2,87–3,66 µm [x = 3,54 ± 0,22 × 3,24 ± 0,22; Qm = 1,09; n = 30]. Ornamentação evidente em MOP;

morfologia detalhada das verrugas não determinada. Eucapilícios amarelados, de paredes retas a levemente sinuosas, 3,36–5,45 µm diam., parede 0,73–1,60 µm, superfície não determinada, lúmen aparente, ramificações não determinadas. Camada micelial composta por hifas hialinas a amareladas, 3,60–9,31 µm diam., parede 1,20–3,89 µm, superfície não determinada, lúmen evidente, ramificações não determinadas. Camada fibrosa formada por hifas hialinas a amareladas, 3,97–6,78 µm diam., parede 1,26–2,25 µm, superfície não determinada, lúmen evidente. Camada pseudoparenquimatosa composta por células subglobosas a ovaladas, 30,34–57,72 × 23,89–51,42 µm.

Rizomorfa presente, conspícua, aderida ao substrato.

Habitat: Liteira e madeira em decomposição.

Hábito: Gregário.

Material examinado: Paraíba, Reserva Biológica Guaribas.

Distribuição: Não determinada.

Observações: O espécime apresenta rizomorfa conspícua e bem desenvolvida, além de peristômio fibriloso não delimitado. A camada micelial apresenta estruturas equinuladas formando projeções espiniformes no exoperídio.

Geastrum aff. setiferum Baseia

Etimologia: Em referência ao aspecto globoso e volumoso do endoperídio observado nos espécimes analisados.

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, marrom-amarelado (6D2), globoso a subgloboso, 11–18 mm de altura × 18 mm de largura, com ápice arredondado, superfície papirácea a cotonosa, livre de incrustações aparentes. Subículo ausente ou não observado. Rizomorfa ausente. Basidioma expandido arqueado, 24,2–31,2 mm de altura × 24–28 mm de largura (incluindo peristômio). Exoperídio aberto formando 5–6 raios, involutos, não higroscópicos. Camada micelial castanho-clara, superfície cotonosa, não persistente, desprendendo-se irregularmente em placas. Camada fibrosa marrom-amarelada (6D2), superfície coriácea. Camada pseudoparenquimatosa cinza-amarronzada (6F2), não persistente, não rimosa, sem formação de colar. Endoperídio cinza-amarronzado (6F2), subgloboso, 16,9–20,3 mm de altura × 16,8–19,2 mm de largura (incluindo peristômio), séssil, superfície pruinosa com estruturas similares à setas. Apófise ausente. Pedicelo ausente. Peristômio fibriloso, não delimitado, cônico, 0,7–2,1 mm de altura, concolor ou discretamente mais escuro que o endoperídio. Gleba marrom-escura.

Basidiosporos amarronzados, globosos a subglobosos, 3,95–5,15 × 3,55–5,15 µm [x = 4,45 ± 0,43 × 4,17 ± 0,45; Qm = 1,07; n = 30]. Ornamentação evidente em MOP; morfologia detalhada das verrugas não determinada; apículo não determinado. Eucapilícios amarelados, de paredes retas a levemente sinuosas, 4,05–5,84 µm diam., parede 1,17–1,94 µm, superfície não determinada, lúmen aparente, ramificações não determinadas. Camada micelial composta por hifas hialinas a amareladas, 3,05–6,92 µm

diam., parede 1,39–3,61 µm, superfície não determinada, lúmen evidente, ramificações não determinadas. Camada fibrosa formada por hifas hialinas a amareladas, 2,49–4,23 µm diam., parede 0,97–1,61 µm, superfície não determinada, lúmen evidente. Camada pseudoparenquimatosa composta por células subglobosas a ovaladas, 25,34–50,59 × 25,50–51,52 µm.

Habitat: Não determinado.

Hábito: Não determinado.

Material examinado: Paraíba, Reserva Biológica Guaribas.

Distribuição: Não determinada.

Observações: O espécime apresenta endoperídio relativamente grande e escuro associado a exoperídio com raios involutos e camada micelial efêmera.Possui estruturas similares à setas por todo endoperídio. A presença de hifas protuberantes no endoperídio não é exclusiva de Geastrum setiferum, sendo também relatada para G. fimbriatum Fr., G. campestre Morgan e G. hieronymi Henn. Entretanto, no material analisado, as projeções apresentam aspecto predominantemente setoso/espiniforme, aproximando-o de G. setiferum.

Geastrum cf. ovalisporumCalonge e Mor.-Arr.

Etimologia: Em referência ao aspecto escurecido e irregular do endoperídio associado ao aspecto superficial semelhante a crescimento fúngico (“mofado”) observado nos espécimes analisados.

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, coloração não determinada, forma não determinada, dimensões não determinadas, com ápice não determinado, superfície não determinada, livre de incrustações aparentes. Subículo não observado. Rizomorfa ausente. Basidioma expandido arqueado, 20,2–24,2 mm de altura × 20–24,6 mm de largura (incluindo peristômio). Exoperídio aberto formando 6–8 raios, arqueados, não higroscópicos. Camada micelial dupla; camada externa branco-amarelada (5A3), superfície papirácea, não incrustada, não persistente, desprendendo-se em placas irregulares; características da camada interna não determinadas. Camada fibrosa branco-amarelada (5A2), superfície coriácea. Camada pseudoparenquimatosa marrom-acinzentada (5F3), não persistente, não rimosa, sem formação de colar. Endoperídio marrom-acinzentado (6F2), globoso a piriforme, 11–16 mm de altura × 9–12 mm largura (incluindo peristômio), pedicelado, superfície pruinosa. Apófise ausente. Pedicelo presente, coloração branco-amarelada, superfície glabra; dimensões não determinadas. Peristômio fibriloso, não delimitado, cônico, 1,6–3,8 mm de altura, coloração 6B2. Gleba marrom-escura.

Basidiosporos amarronzados, globosos a subglobosos, 2,74–3,61 × 2,64–3,78 µm [x = 3,22 ± 0,28 × 3,07 ± 0,31; Qm = 1,05; n = 30]. Ornamentação evidente em MOP; morfologia detalhada das verrugas não determinada; apículo não determinado. Eucapilícios amarelados, de paredes retas a levemente sinuosas, 3,28–5,69 µm diam., parede 1,45–2,62 µm, superfície não determinada, lúmen aparente, ramificações não determinadas. Camada micelial composta por hifas hialinas a amareladas, 1,12–1,68 µm

diam., parede 1,16–1,63 µm, superfície não determinada, lúmen evidente, ramificações não determinadas. Camada fibrosa formada por hifas hialinas a amareladas, 4,28–6,99 µm diam., parede 1,72–2,65 µm, superfície não determinada, lúmen evidente. Camada pseudoparenquimatosa composta por células subglobosas a ovaladas, 26,04–43,37 × 26,12–41,34 µm.

Habitat: Não determinado.

Hábito: Não determinado.

Material examinado:RT–04.

Distribuição: Não determinada.

Observações: O espécime apresenta endoperídio pedicelado associado a peristômio fibriloso não delimitado, exoperídio com 6–8 raios arqueados e camada micelial dupla. O conjunto de caracteres aproxima o material de Geastrum aff. ovalisporum, principalmente pela presença de exoperídio estratificado, pedicelo discreto e padrão geral do basidioma. Difere-se de espécies morfologicamente próximas como G. pectinatum Pers. por não apresentar pedicelo longo e bem desenvolvido, além de possuir basidiosporos menores. Difere-se ainda de espécies do complexo G. striatum D.C. pela ausência de apófise conspícua e de sulcos peristomiais bem definidos.

Geastrum saccatum Fr.

Etimologia: Em referência ao aspecto irregular e enrugado observado no exoperídio e no endoperídio dos espécimes analisados.

Descrição: Basidioma imaturo epígeo, marrom-amarelado (5C3), piriforme, 8–11 mm de altura × 10,3 mm de largura, com ápice umbonado, superfície cotonosa, livre de incrustações aparentes. Subículo ausente. Rizomorfa presente, 13,6 mm de comprimento, superfície não incrustada. Basidioma expandido saculiforme, 12,2–14 mm de altura × 12,3–16,3 mm de largura (incluindo peristômio). Exoperídio aberto formando 7–8 raios, não higroscópicos. Camada micelial aparentemente simples, branco-amarelada (5D2), superfície papirácea, não incrustada, persistente, desprendendo-se em placas irregulares. Camada fibrosa branco-amarelada (6D3), superfície cotonosa, com aspecto espesso. Camada pseudoparenquimatosa marrom-amarelada (5D4–5F4), persistente, não rimosa, sem formação de colar. Endoperídio marrom-amarelado (5D3), irregular a subgloboso, 8,9–11 mm de altura × 10–11,5 mm de largura (incluindo peristômio), séssil, superfície com hifas protuberantes. Apófise ausente. Pedicelo ausente. Peristômio fimbriado, não delimitado, cônico, 1,2–2,2 mm de altura, coloração 5C3. Gleba marrom-escura.

Basidiosporos amarronzados, globosos a subglobosos, 1,93–2,38 × 1,81–2,28 µm [x = 2,11 ± 0,12 × 2,04 ± 0,14; Qm = 1,04; n = 30]. Ornamentação evidente em MOP; morfologia detalhada das verrugas não determinada; apículo não determinado. Eucapilícios amarelados, de paredes retas a levemente sinuosas, 1,70–3,29 µm diam., parede 0,64–1,35 µm, superfície não determinada, lúmen aparente, ramificações não determinadas. Camada micelial composta por hifas hialinas a amareladas, 3,46–5,66 µm diam., parede 1,51–2,37 µm, superfície não determinada, lúmen evidente, ramificações

não determinadas. Camada fibrosa formada por hifas hialinas a amareladas, 3,24–5,13 µm diam., parede 1,25–2,39 µm, superfície não determinada, lúmen evidente. Camada pseudoparenquimatosa composta por células subglobosas a ovaladas, 30,59–60,94 × 31,00–62,09 µm.Rizomorfa composta por hifas não determinadas, 13,6 mm comprimento; demais características não determinadas.

Habitat: Não determinado.

Hábito: Gregário.

Material examinado: Paraíba, Reserva Biológica Guaribas..

Distribuição: Não determinada.

Observações: O espécime apresenta basidiomas pequenos com endoperídio irregular associado à presença de hifas protuberantes e peristômio fimbriado não delimitado. A delimitação da camada micelial como simples ou dupla permanece incerta, necessitando observação complementar em cortes do exoperídio. Caracteres relacionados à ornamentação detalhada dos basidiosporos e das hifas também requerem análises adicionais.

Conclusão

O estudo corroborou a ocorrência de cinco espécies de Geastrum na Reserva Biológica Guaribas (PB), ampliando a distribuição geográfica das espécies Geastrum cf javanicum, Geastrum aff. echinulatum, Geastrum aff. setiferum, Geastrum cf. ovalisporum e Geastrum saccatum no Nordeste brasileiro. Os resultados obtidos enriquecem o acervo da Coleção UFRN-Fungos, fornecem base para pesquisas futuras e também ilustram a complexidade da diversidade do gênero na região.

O trabalho taxonômico baseado em morfologia mostrou-se satisfatório para a identificação das espécies, sendo fundamental para gerar dados primários de ocorrência e distribuição, constituir coleções de referência devidamente curadas e fornecer a base morfológica sólida necessária para estudos futuros. Este tipo de trabalho serve de base essencial para pesquisas aplicadas em bioprospecção e conservação, ainda mais considerando o potencial do gênero Geastrum como fonte de compostos de interesse farmacológico,industrial (Freitas-Neto, 2021) e sua função ecológica como decompositor e potencial formador de micorrizas.

Recomenda-se a continuidade de coletas sistemáticas em diferentes estações e fitofisionomias, bem como a integração de estudos moleculares para elucidar complexos de espécies e investigar relações filogenéticas. Estudos futuros, incluindo os materiais já coletados em outras unidades de conservação (FLONA de Nísia Floresta/RN, Parque das Dunas/RN e Mata do Pau-Ferro/PB), são essenciais para consolidar o conhecimento da diversidade do gênero e fornecer base científica sólida para estratégias de conservação da biodiversidade no Bioma Mata Atlântica nordestino.

Referências

ACCIOLY, T. et al. Hidden fungal diversity from the Neotropics: Geastrum hirsutum, G. schweinitzii (Basidiomycota, Geastrales) and their allies. PLoS ONE, v. 14, n. 2, 2019.

CABRAL, T. S. et al. A new species of Geastrum (Basidiomycota) from the Brazilian Amazon. Phytotaxa, v. 297, n. 3, p. 267–275, 2017.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 625-715. Persoonia, v. 39, p. 270–467, 2017.

FREITAS NETO, J. F. O gênero Geastrum (Geastrales, Basidiomycota): uma nova espécie brasileira de fungo estrela-da-terra. 2021. 30 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/46795. Acesso em: 2 jun. 2025.

KIRK, P. M. et al. Dictionary of the Fungi. 10. ed. Reino Unido: CABI Int. Publ., 771 p. 2008.

KORNERUP, A.; WANSCHER, J. E. Methuen Handbook of Colour. 3. ed. London: Methuen, 243 p. 1978.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, p. 853–858, 2000.

PERSOON, C. H. Synopsis Methodica Fungorum. [S.l.: s.n.], 1801. p. 131-135.

PIRES, Á. B. et al. O gênero Geastrum (Geastraceae, Basidiomycota) na Mata Atlântica baiana: novas ocorrências e checklist para o Nordeste do Brasil. Hoehnea, v. 50, e332023, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1590/2236-8906e332023. Acesso em: 5 jun. 2025.

SILVA, B. D. B.; SULZBACHER, M. A.; BASEIA, I. G. Metodologia. In: BASEIA, I. G.; SILVA, B. D. B.; CRUZ, R. H. S. F. (Org.). Fungos gasteroides no semiárido do Nordeste brasileiro. Feira de Santana: Print Mídia, 2014.

SOTO, M. K.; WRIGHT, J. E. Taxonomia Del gênero Geastrum (Basidiomycetes, Lycoperdales) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot., v. 34, n. 3-4, p. 185-201, 2000.

SOUSA, J. O. O gênero Geastrum Pers. (Geastraceae, Basidiomycota): ocorrência, chave taxonômica e descrições de novas espécies do nordeste brasileiro. 2015. 162 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Centro de Biociências,

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/20067. Acesso em: 5 jun. 2025.

SOUSA, J. O. et al. New records of Geastraceae (Basidiomycota: Phallomycetidae) from Atlantic rainforest remnants and relicts of northeastern Brazil. Darwiniana, nueva serie, v. 2, n. 2, p. 240-249, 2014.

SOUSA, J. O. et al. Geastrum laevisporum: a new earthstar fungus with uncommon smooth spores. Mycosphere, v. 6, n. 4, p. 501–507, 2015. DOI: 10.5943/mycosphere/6/4/12.

SUNHEDE, S. Geastraceae (Basidiomycotina). Morphology, ecology and systematics with special emphasis on the North European species. Oslo: Fungiflora, 1989. (Synopsis Fungorum 1).

ZAMORA, J. C. et al. New sources of taxonomic information for earthstars (Geastrum, Geastraceae, Basidiomycota): phenoloxidases and rhizomorph crystals. Phytotaxa, v. 131, p. 1-10, 2013.

ZAMORA, J. C. et al. Systematics of the genus Geastrum (Fungi: Basidiomycota) revisited. Taxon, v. ARAÚJO, R. V. B. et al. Taxonomic and phylogenetic studies reveal new species of Geastrum from Brazil. Mycological Progress, 2026.

YANG, X. et al. Morphology and multigene phylogeny reveal new species of Geastrum. MycoKeys, 2025.

FREITAS, I. L. F. S. et al. Geastrum argentum, a new species from the Atlantic Rainforest. New Zealand Journal of Botany, 2025.

CÓDIGO: SB0670

AUTOR: ELOISE FERNANDA DA SILVA CARDOSO

COAUTOR: ANA KAROLINA DOS SANTOS SILVA

ORIENTADOR: JULIANA DEO DIAS

TÍTULO: INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE ALIMENTO NA ECLOSÃO DE ESTÁGIOS DORMENTES DO ZOOPLÂNCTON

Resumo

O banco de estágios dormentes do zooplâncton, presente no sedimento de ambientes aquáticos, representa uma reserva de biodiversidade e contribui para a persistência de suas populações em condições ambientais adversas. Entretanto, fatores que estimulam a eclosão, como a disponibilidade de alimento, ainda são pouco compreendidos, especialmente em ambientes semiáridos. Neste estudo, avaliamos o efeito da adição de microalga no número de eclosões, no tempo de eclosão e na riqueza de táxons provenientes do banco de estágios dormentes do zooplâncton de três reservatórios do semiárido. O experimento foi realizado em microcosmos artificiais, com dois tratamentos: controle e com microalga, mantidos nas mesmas condições experimentais, durante cinco semanas. O tratamento com microalga apresentou maior número de eclosões em comparação ao tratamento controle (247 x 58), com os reservatórios Dourado e Gargalheiras apresentando diferença significativa entre os tratamentos. A riqueza de táxons também foi maior no tratamento com microalga do que no controle (17 x 14 táxons), porém apenas o reservatório Gargalheiras apresentou diferença significativa. Não foram observadas eclosões mais rápidas com a adição de microalga. Os resultados mostram que o efeito da adição de microalga diferiu entre os reservatórios, e a microalga pode ter favorecido mais eclosões, porém não antecipou o início das eclosões.

Palavras-chave: banco de estágios dormentes; zooplâncton; disponibilidade de alimento.

TITLE: INFLUENCE OF FOOD AVAILABILITY ON THE HATCHING OF ZOOPLANKTON DORMANT STAGES

Abstract

The zooplankton dormant-stage bank, found in the sediment of aquatic environments, represents a reservoir of biodiversity and contributes to the persistence of zooplankton populations under adverse environmental conditions. However, factors that stimulate hatching, such as food availability, are still poorly understood, especially in semiarid environments. In this study, we evaluated the effect of microalgae addition on the number of hatching events, hatching timing, and taxon richness from the zooplankton dormant-stage bank in three reservoirs in the semiarid region. The experiment was conducted in artificial microcosms with two treatments: control and microalgae, both maintained under the same experimental conditions for five weeks. The microalgae treatment showed a higher number of hatching events than the control treatment (247 vs. 58), with the Dourado and Gargalheiras reservoirs showing a significant difference between the treatments. Taxon richness was also higher in the microalgae treatment than in the control (17 vs. 14 taxa), although only the Gargalheiras reservoir showed a significant difference. No faster hatching was observed with the addition of microalgae. The results show that the effect of adding microalgae differed among the reservoirs, and microalgae may have promoted more hatching events, but did not accelerate the onset of hatching.

Keywords: dormant-stage bank; zooplankton; food availability.

Introdução

A comunidade zooplanctônica é composta por organismos heterotróficos microscópicos que habitam corpos hídricos. Esses organismos são essenciais para a transferência de energia e matéria nos ecossistemas aquáticos (Altindağ; Berdi; Külköylüoğlu, 2025). Em ambientes de água doce, os principais representantes do zooplâncton são os rotíferos, cladóceros e copépodes (Cabral *et al*., 2020).

O zooplâncton é capaz de produzir estágios dormentes que se depositam no sedimento dos ambientes aquáticos, garantindo a persistência de suas populações em condições ambientais adversas, como redução da disponibilidade de alimento, predação ou eventos de seca (Brendonck; De Meester, 2003). As fases latentes compreendem a diapausa, associada à produção de ovos de resistência, como ocorre em copépodes calanóides, cladóceros, rotíferos e ostrácodes, e a quiescência, caracterizada pela redução da atividade metabólica, observada em copépodes ciclopóides e rotíferos bdellóides (Morais-Júnior *et al*., 2025; Santangelo *et al.*, 2015). Os ovos de resistência são produzidos em diferentes períodos e se acumulam, formando o chamado banco de ovos (De Stasio, 2007), os quais podem permanecer viáveis por décadas ou séculos sob condições extremas (Brendonck; Pinceel; Ortells, 2017; Meyer-milne; Brendonck; Pinceel, 2022).

Os ambientes aquáticos do semiárido nordestino são fortemente influenciados pela flutuação hidrológica devido às características climáticas da região, como a menor taxa de precipitação e as temperaturas mais elevadas ao longo do ano (Barbosa *et al*., 2012). Essas condições ocasionam escassez de recursos hídricos com mais frequência, com secas

que podem se prolongar por anos (Marengo; Torres; Alves, 2017; Medeiros *et al*., 2025), impactando as comunidades aquáticas, a ciclagem de nutrientes e a qualidade da água.

Diversas condições ambientais podem influenciar a eclosão de formas dormentes do zooplâncton, incluindo fatores abióticos, como o fotoperíodo e temperatura, e condições hidrológicas, como a inundação, além de fatores bióticos, como a disponibilidade de alimento (Brendonck; Pinceel; Ortells, 2017; Gyllström; Hansson, 2004; Minkoff; Lubzens; Kahan, 1983). O fitoplâncton constitui um dos principais recursos alimentares do zooplâncton, e sua qualidade e quantidade influenciam a taxa de crescimento e a produção de descendentes (Vanni; Lampert, 1992). Nesse contexto, trabalhos experimentais têm identificado um efeito importante da disponibilidade de alimento para a eclosão de formas dormentes. Por exemplo, Minkoff, Lubzens e Kahan (1983) observaram que a adição da microalga *Chlorella stigmatophora* Butcher, 1952, e sob iluminação, aumentou a taxa de eclosão de ovos de resistência de *Brachionus plicatilis* Müller, 1786. Mais recentemente, Zamorano e Contreras (2023) demonstraram que os tratamentos com a microalga *Scenedesmus acutus* Meyen, 1829 e com a cianobactéria *Microcystis* sp. aumentaram a taxa de eclosão e riqueza de espécies provenientes do banco de ovos.

Estimular a eclosão das formas dormentes do zooplâncton permite acessar a biodiversidade e compreender a persistência da comunidade nos ambientes aquáticos mediante eventos extremos. No entanto, poucos trabalhos têm investigado os fatores que facilitam a eclosão dos estágios dormentes do zooplâncton, como a disponibilidade de alimento, sobretudo nas regiões semiáridas. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de microalga no número de eclosões e na riqueza de táxons provenientes do banco de estágios dormentes do zooplâncton, presentes no sedimento de reservatórios localizados na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte. As hipóteses que nortearam o estudo foram: i) A adição de microalga reduz o tempo de eclosão de estágios dormentes do zooplâncton devido à disponibilidade de alimento; ii) A adição de microalga aumenta o número de eclosões e a riqueza de táxons provenientes do banco de estágios dormentes do zooplâncton, em comparação ao tratamento sem microalga.

Metodologia

2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em três reservatórios localizados na bacia hidrográfica do Rio Piancó-Piranhas-Açu, na região Seridó, estado do Rio Grande do Norte, Brasil (Figura 1). Os reservatórios estudados foram: (i) Cruzeta, localizado no município de Cruzeta, com capacidade máxima de armazenamento de 23,5 milhões de m³ e profundidade máxima de 8,7 m; (ii) Dourado, no município de Currais Novos, com capacidade máxima de armazenamento de 10,3 milhões de m³ e profundidade máxima de 14,5 m; e (iii)

Marechal Dutra (Gargalheiras), no município de Acari, com capacidade máxima de armazenamento de 44,4 milhões de m³ e profundidade máxima de 26,5 m (ANA, 2026). Os açudes Cruzeta e Dourado são classificados como eutróficos, enquanto Gargalheiras é classificado como hipereutrófico (Costa *et al*., 2024; Medeiros *et al.*, 2015; Pinheiro *et al*., 2022).

O clima da região é o semiárido quente (BSh – classificação de Köppen-Geiger) com precipitação média anual inferior a 800 mm, temperatura média anual superior a 26,5 °C e estação seca entre os meses de agosto e dezembro (Alvares *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2012). Entre 2012 e 2019, a região enfrentou uma seca severa, período em que os três reservatórios atingiram volumes críticos de armazenamento. Os reservatórios são utilizados prioritariamente para abastecimento urbano, mas também para pesca, irrigação agrícola, dessedentação de animais e recreação (Costa *et al*., 2024; Medeiros *et al.*, 2015; Pinheiro *et al*., 2022). Dessa forma, desempenham um papel fundamental para a qualidade de vida da população do Seridó e para a manutenção dos ecossistemas aquáticos e terrestres.

2.2 Amostras de sedimento e montagem do experimento

As amostras de sedimento foram coletadas em março de 2026 com uma draga do tipo Petersen, em pontos aleatórios de cada reservatório, e armazenadas em recipientes plásticos. No Laboratório de Ecologia Aquática do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN, as amostras foram distribuídas em bandejas plásticas e secas à temperatura ambiente durante 18 dias. Após a secagem, os sedimentos foram peneirados em peneira granulométrica. Posteriormente, o sedimento foi pesado em balança analítica e cada unidade experimental (potes plásticos) recebeu 100g de sedimento para a realização do experimento.

O experimento foi conduzido em microcosmos artificiais (potes plásticos), totalizando seis unidades experimentais, correspondentes aos três reservatórios e aos dois tratamentos (controle e com microalga). Foi utilizada uma estrutura com tubos de PVC para a fixação de mini refletores de LED. A iluminação foi controlada por um temporizador, simulando um fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Cada unidade experimental recebeu 100g de sedimento e 300ml de água destilada, simulando uma inundação. Ambos os tratamentos foram mantidos sob as mesmas condições experimentais, diferindo apenas pela adição de 2ml da cultura de *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, 1835 no tratamento com microalga. A concentração da cultura de microalga foi de aproximadamente 500 mg/L. As adições de microalga ocorreram no início do experimento e após cada coleta. Por fim, as unidades experimentais foram dispostas ao acaso (Figura 2).

2.3 Experimento de eclosão

O experimento de eclosão de formas dormentes do zooplâncton teve duração de cinco semanas. Na primeira semana, as amostragens ocorreram diariamente para avaliar se a adição de microalga favorece que o zooplâncton ecloda mais rápido. A partir da segunda semana, as coletas ocorreram a cada dois dias, a fim de garantir que os organismos eclodidos fossem oriundos do banco de formas dormentes, e não da reprodução nas unidades experimentais (Nielsen *et al*., 2013).

A cada coleta, o sobrenadante dos recipientes foi filtrado em uma rede de plâncton de 68 µm de abertura de malha. Após a filtração, foram adicionadas nova água destilada e microalga no tratamento específico. Em placas de *Sedgewick-Rafter*, sob microscópio óptico, os organismos coletados foram identificados, com o auxílio de chaves de identificação (Elmoor-Loureiro, 1997; Koste, 1978), até o menor nível taxonômico possível e contabilizados. Os náuplios coletados durante o experimento foram transferidos para uma placa de cultura celular de 24 poços para acompanhar seu desenvolvimento.

2.4 Análises estatísticas

As variáveis dependentes avaliadas foram o número de eclosões e a riqueza de táxons, já a variável independente foram os tratamentos com e sem microalga. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados, enquanto o teste de Levene avaliou a homoscedasticidade. A partir dos resultados obtidos, optou-se pelo teste t pareado (paramétrico), quando os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade foram atendidos, e pelo teste de Wilcoxon (não paramétrico), quando esses pressupostos não foram atendidos.

As análises estatísticas foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2026). Os pacotes utilizados para a geração dos gráficos, manipulação de planilhas e realização dos testes estatísticos foram ggplot2 (Wickham, 2016) e ggpubr (Kassambara, 2026); dplyr (Wickham *et al.*, 2026); vegan (Oksanen *et al.*, 2026) e car (Fox; Weisberg, 2019), respectivamente.

Resultados e Discussões

Ao longo do experimento foi registrado um total de 305 eclosões de zooplâncton, sendo 247 no tratamento com microalga e 58 no controle. Os rotíferos, cladóceros e ostrácodes predominaram em ambos os tratamentos (Tabela A1). Sob efeito da adição de microalga, os reservatórios Cruzeta e Dourado apresentaram os maiores valores observados (100 e 108 eclosões, respectivamente). Os primeiros indivíduos eclodiram no primeiro dia de análise em todos os reservatórios. Nesse primeiro dia, no tratamento com adição de microalga, foram registradas duas eclosões de *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766 em Gargalheiras e uma de *Brachionus falcatus* Zacharias,1898 em Dourado. No tratamento controle, foram registrados um náuplio de branconeta em Cruzeta e um em Dourado, como também um rotífero *Filinia* sp. em Dourado.

Durante a primeira semana de experimento, o número de eclosões foi semelhante entre os tratamentos, como evidenciado pela proximidade das curvas nesse período. A partir do dia 04 de maio, início da quarta semana, observou-se um aumento expressivo no número de eclosões nos microcosmos com adição de microalga, ao passo que o tratamento controle demonstrou pequenas oscilações ao longo dos dias (Figura 3). Contudo, os dados obtidos não permitem afirmar que a adição de microalga antecipa o início das eclosões dos estágios dormentes do zooplâncton, pois o número de organismos eclodidos nos dois grupos experimentais apresentou diferenças sutis por aproximadamente três semanas. Esse resultado pode estar relacionado a condições ambientais favoráveis para à eclosão, como o fotoperíodo e a inundação dos sedimentos (Brendonck; Pinceel; Ortells, 2017; Gyllström; Hansson, 2004), presentes em ambos os tratamentos. Minkoff, Lubzens e Kahan (1983) observaram que, na ausência de luz, as taxas de eclosão de ovos de resistência foram baixas, mesmo com a disponibilidade de alimento, evidenciando a importância da luz para às eclosões. Ainda nesse trabalho, a adição da microalga *Chlorella stigmatophora* favoreceu uma maior taxa de eclosão sob condições de iluminação. Tendo em vista que os tratamentos do presente estudo foram submetidos às mesmas condições favoráveis para à eclosão, a influência da adição de microalga pode ter sido reduzida, não ocasionando eclosões mais rápidas.

Considerando todos os reservatórios analisados, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com e sem adição de microalga quanto ao aumento do número de eclosões ($t = -2{,}982$; $p = 0{,}096$) (Figura 4). O resultado estatisticamente não significativo pode estar relacionado à variabilidade entre os reservatórios, alguns com maior número de eclosões do que outros, e poucas réplicas, o que pode ter reduzido o poder estatístico do teste. No entanto, podemos observar que o número de eclosões de cada um dos reservatórios foi maior no tratamento com microalga do que no tratamento controle.

Ao comparar os reservatórios, o teste de Wilcoxon revelou que houve diferença significativa no número total de eclosões entre os grupos controle e com microalga em

Dourado (V = 102; p = 0,007) e em Gargalheiras (V = 97; p = 0,012) (Figura 5). Esse resultado pode estar relacionado à adição da microalga, que, além de representar uma possível fonte de alimento após a eclosão, pode ter alterado as condições do microcosmo. Por meio da atividade fotossintética, *Scenedesmus quadricauda* utiliza CO_2 e libera O_2 (Kaftan *et al.*, 1999), o que pode favorecer a oxigenação da água. Broman *et al.* (2015) observaram que a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água pode contribuir para a eclosão de ovos de resistência do zooplâncton. Assim, a microalga pode ter favorecido as eclosões tanto pela disponibilidade de alimento quanto pela possível contribuição para a oxigenação dos microcosmos. Por outro lado, o reservatório Cruzeta não apresentou diferenças estatisticamente significativas (V = 54; p = 0,125). Embora o tratamento com microalga tenha apresentado no total 100 eclosões e 2 no controle, 94 dessas eclosões corresponderam a rotíferos da ordem Bdelloidea, indicando a concentração das eclosões em um único táxon.

Ao longo do experimento foi registrado um total de 19 táxons de zooplâncton, sendo 17 no tratamento com microalga (11 rotíferos e 6 cladóceros), e 14 no tratamento controle (11 rotíferos e 3 cladóceros). Não foi registrado nenhum indivíduo adulto de copépodes. Os náuplios que eclodiram foram mantidos em laboratório por quase 30 dias e identificados como da ordem Calanoida. Não foi possível chegar até o nível de espécie. Os reservatórios que apresentaram maior número de táxons exclusivos foram Dourado com oito e Gargalheiras com três. Dourado e Gargalheiras apresentaram maior riqueza, compartilhando táxons como *Diaphanosoma spinulosum* Herbst, 1975, *Asplanchna* sp. e *Filinia* sp., enquanto os rotíferos Bdelloidea e *Proales* sp. ocorreram nos três reservatórios.

Inicialmente, os grupos exibiram riqueza de táxons semelhante, com o tratamento controle apresentando riqueza ligeiramente mais elevada do que o tratamento com microalga. Ao longo do experimento, o grupo controle apresentou maior variação na riqueza de táxons e o grupo com adição de microalga manteve riqueza mais elevada até o final do experimento (Figura 6). Essa tendência pode estar associada à disponibilidade de recursos alimentares. Zamorano e Contreras (2023) observaram, em um experimento com diferentes tratamentos bióticos, que a maior riqueza de espécies eclodidas ocorreu com a adição da cianobactéria *Microcystis* sp., enquanto a segunda maior riqueza foi registrada com a adição da microalga *Scenedesmus acutus*. Esse resultado sugere que fatores bióticos, como a disponibilidade de alimento, podem estar relacionados à emergência de espécies presentes no banco de formas dormentes. No presente estudo, foi utilizada apenas a microalga *Scenedesmus quadricauda*, não sendo possível comparar se outros recursos alimentares produziram respostas diferentes sobre a riqueza dos táxons eclodidos.

No tratamento controle, ao final do experimento, foi observada uma tendência de aumento da riqueza de táxons, isso pode estar associado à disponibilidade de alimento, mesmo não tendo sido adicionado. Esse padrão pode estar relacionado às condições experimentais, como a disponibilidade de luz e água, que podem ter favorecido, ao longo das semanas,

o desenvolvimento e a colonização por organismos fotossintetizantes, aumentando a disponibilidade de recursos alimentares nos microcosmos. Puppin-Gonçalves *et al*. (2026) observaram o início das eclosões de cladóceros após o desenvolvimento de biofilmes de microalgas e da maior abundância de ciliados nos microcosmos, em um experimento no qual o alimento não foi utilizado como gatilho para as eclosões. Assim, mesmo sem a adição de microalga, o aumento da riqueza de táxons no tratamento controle, observado ao final do experimento, pode estar relacionado ao desenvolvimento gradual de recursos alimentares ao longo do tempo.

Do mesmo modo que o total das eclosões, a riqueza de táxons não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($t = -1{,}808$; $p = 0{,}212$) (Figura 7). Esse resultado pode estar relacionado à utilização de uma única espécie de microalga, que pode não ter atendido igualmente às diferentes preferências alimentares dos táxons presentes no banco de estágios dormentes. Os grupos zooplanctônicos de água doce apresentam diferentes preferências alimentares, condicionadas por suas características funcionais, como o tamanho corporal e os apêndices filtradores, bem como pelas características morfológicas e funcionais do fitoplâncton, como o tamanho, o formato, a qualidade nutricional, a presença de espinhos ou mucilagem e toxicidade, fatores que determinam a seleção e a eficiência de consumo do alimento (Colina *et al*., 2016). Assim, a utilização de uma única espécie de microalga pode ter favorecido apenas parte da comunidade dormente, enquanto outros táxons podem ter apresentado respostas diferentes, o que pode estar associado à ausência de diferença significativa na riqueza entre os tratamentos.

O teste de Wilcoxon revelou que não houve diferença estatisticamente significativa na riqueza de táxons entre os tratamentos em Cruzeta ($V = 54$; $p = 0{,}125$) e Dourado ($V = 79{,}5$; $p = 0{,}243$). No entanto, Gargalheiras apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($V = 101$; $p = 0{,}009$) (Figura 8), com maior riqueza no tratamento com adição de microalga. Em Dourado, apesar da maior riqueza e do maior número de táxons exclusivos, foi observado o mesmo número de táxons em ambos os tratamentos, indicando que a adição de microalga não alterou a riqueza nesse reservatório. Em Cruzeta, o menor número de táxons pode ter contribuído para a ausência de diferença entre os tratamentos. Dessa forma, a segunda hipótese é parcialmente aceita, pois a adição de microalga aumentou a riqueza de táxons apenas em Gargalheiras. Esse resultado sugere que a resposta à adição de microalga pode estar relacionada à composição taxonômica do banco de formas dormentes de cada reservatório.

Conclusão

O presente estudo avaliou o efeito da adição de *Scenedesmus quadricauda* no número de eclosões e na riqueza de táxons provenientes do banco de estágios dormentes do zooplâncton, em três reservatórios do semiárido. A primeira hipótese foi rejeitada: a adição de microalga não promoveu eclosões mais rápidas, enquanto a segunda hipótese foi parcialmente aceita, pois o efeito da adição de microalga no número de eclosões e na riqueza de táxons variou entre os reservatórios. De modo geral, o tratamento com microalga apresentou o maior número de eclosões e a maior riqueza de táxons em comparação ao tratamento controle. Os reservatórios Dourado e Gargalheiras apresentaram diferença significativa no número total de eclosões entre os tratamentos. Já na riqueza de táxons somente Gargalheiras apresentou diferença significativa. O tratamento controle manteve valores baixos no número de eclosões, enquanto na riqueza de táxons apresentou maior variabilidade. A adição de microalga pode ter favorecido mais eclosões tanto por ser um recurso alimentar quanto pela possível oxigenação dos microcosmos, e em relação à riqueza de táxons, a microalga pode ter atendido às preferências alimentares apenas de uma parte da comunidade dormente. No tratamento controle, as eclosões podem ter sido influenciadas pelas condições favoráveis, como o fotoperíodo e a inundação nas unidades experimentais, e a riqueza de táxons pode estar associada ao desenvolvimento gradual de recursos alimentares (por exemplo, biofilmes de microalgas) nos microcosmos ao longo dos dias. O estudo se limitou ao efeito de apenas uma espécie de microalga, e fatores como oxigenação da água e outros recursos alimentares não foram analisados. A disponibilidade de alimento para estimular as eclosões ainda é pouco compreendida, sobretudo nas regiões semiáridas. Assim, investigar fatores que favoreçam as eclosões frente às mudanças ambientais permite compreender a biodiversidade, a persistência e a resiliência dos organismos zooplanctônicos nos ecossistemas aquáticos.

Referências

ALTINDAĞ, A.; BERDİ, D.; KÜLKÖYLÜOĞLU, O. The hidden impact of global warming on the structure and dynamics of zooplankton communities in freshwater habitats. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 97, n. 4, e20241273, 2025.

ALVARES, C.A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ANA - Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. Disponível em: https://www.ana.gov.br/sar/nordeste-e-semiarido/rio-grande-do-norte. Acesso em: 17 jul. 2026.

BARBOSA, J.E. de L. et al. Aquatic systems in semi-arid Brazil: limnology and management. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 24, n. 1, p. 103–118, 2012.

BRENDONCK, L.; DE MEESTER, L. Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. Hydrobiologia, v. 491, n. 1, p. 65–84, 2003.

BRENDONCK, L.; PINCEEL, T.; ORTELLS, R. Dormancy and dispersal as mediators of zooplankton population and community dynamics along a hydrological disturbance gradient in inland temporary pools. Hydrobiologia, v. 796, p. 201–222, 2017.

BROMAN, E. et al. Oxygenation of anoxic sediments triggers hatching of zooplankton eggs. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 282, n. 1817, e20152025, 2015.

CABRAL, C.R. et al. Zooplankton species distribution, richness and composition across tropical shallow lakes: A large scale assessment by biome, lake origin, and lake habitat. International Journal of Limnology, v. 56, art. 25, 2020.

COLINA, M. et al. A trait-based approach to summarize zooplankton–phytoplankton interactions in freshwaters. Hydrobiologia, v. 767, p. 221–233, 2016.

COSTA, M.R.A. et al. Phytoplankton functional responses induced by extreme hydrological events in a tropical reservoir. Hydrobiologia, v. 851, p. 849–867, 2024.

DE STASIO, B.T. Egg bank formation by aquatic invertebrates: a bridge across disciplinary boundaries. In: ALEKSEEV, V.R.; DE STASIO, B.T.; GILBERT, J.J. (org.). Diapause in aquatic invertebrates: theory and human use. Dordrecht: Springer, 2007. p. 121-133. (Monographiae Biologicae, v. 84).

ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil. Brasília: Universa, 1997. 156 p.

FOX, J.; WEISBERG, S. An R Companion to Applied Regression. 3. ed. Thousand Oaks: Sage, 2019. Disponível em: https://www.john-fox.ca/Companion/. Acesso em: 11 jul. 2026.

GYLLSTRÖM, M.; HANSSON, L.A. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. Aquatic Sciences, v. 66, n. 3, p. 274–295, 2004.

KAFTAN, D. et al. Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga Scenedesmus quadricauda. Plant Physiology, v. 120, n. 2, p. 433-442, 1999.

KASSAMBARA, A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. Version 0.6.3, 2026. DOI: 10.32614/CRAN.package.ggpubr. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/ package=ggpubr. Acesso em: 11 jul. 2026.

KOSTE, W. Rotatoria: die Rädertiere Mitteleuropas: ein Bestimmungswerk, begründet von Max Voigt. Überordnung Monogononta. 2. Aufl. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1978. v. 2: Tafelband.

MARENGO, J.A.; TORRES, R.R.; ALVES, L.M. Drought in Northeast Brazil—past, present, and future. Theoretical and Applied Climatology, v. 129, p. 1189–1200, 2017.

MEDEIROS, C.R. et al. How does the storage volume of semi-arid reservoirs change water quality and modulate the diversity of benthic macroinvertebrates? Science of The Total Environment, v. 958, e177881, 2025.

MEDEIROS, L.C. et al. Is the future blue-green or brown? The effects of extreme events on phytoplankton dynamics in a semi-arid man-made lake. Aquatic Ecology, v. 49, p. 293–307, 2015.

MEYER-MILNE, E.; BRENDONCK, L.; PINCEEL, T. Egg banks in dryland wetlands provide information on the diversity and vulnerability of branchiopod communities along a longitudinal aridity gradient. Wetlands Ecology and Management, v. 30, p. 813–826, 2022.

MINKOFF, G.; LUBZENS, E.; KAHAN, D. Environmental factors affecting hatching of rotifer (Brachionus plicatilis) resting eggs. Hydrobiologia, v. 104, p. 61–69, 1983.

MORAIS-JÚNIOR, C.S. et al. Spatial distribution of resting egg banks in man-made seasonal pools from semiarid Caatinga. Hydrobiologia, v. 852, n. 14, p. 3673–3685, 2025.

NIELSEN, D.L. et al. Empirical evidence linking increased hydrologic stability with decreased biotic diversity within wetlands. Hydrobiologia, v. 708, n. 1, p. 81–96, 2013.

OKSANEN, J. et al. vegan: Community Ecology Package. Version 2.7-5, 2026. DOI: 10.32614/CRAN.package.vegan. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/package=vegan. Acesso em: 11 jul. 2026.

PINHEIRO, T.L. et al. Agricultural activity enhances CO2 and CH4 emissions after sediment rewetting in a tropical semiarid reservoir. Hydrobiologia, v. 849, p. 3979–3993, 2022.

PUPPIN-GONÇALVES, C.T. et al. Hatching triggers and diversity patterns of zooplankton dormant stages in groundwater ecosystems of the Caatinga drylands. Hydrobiologia, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10750-025-06098-4 Acesso em: 15 ago. 2026.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2026. DOI: 10.32614/R.manuals. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: 11 jul. 2026.

SANTANGELO, J.M. et al. Community structure of resting egg banks and patterns of concordance between dormant and active zooplankton in tropical lakes. Hydrobiologia, v. 758, p. 183-195, 2015.

VANNI, M.J.; LAMPERT, W. Food quality effects on life history traits and fitness in the generalist herbivore Daphnia. Oecologia, v. 92, p. 48–57, 1992.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2016.

WICKHAM, H. et al. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. Version 1.2.1, 2026. DOI: 10.32614/CRAN.package.dplyr. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/package=dplyr. Acesso em: 11 jul. 2026.

ZAMORANO, J.G.; CONTRERAS, J.J. Zooplankton egg bank: characterization and effect of biotic factors on hatching. International Journal of Limnology, v. 59, art. 3, 2023.

Anexos



Figura 1 - Mapa da área de estudo no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, indicando a localização dos reservatórios Cruzeta, Dourado e Gargalheiras, presentes na Bacia hidrográfica Rio Piancó-Piranhas-Açu.



Figura 2 - Montagem experimental em microcosmos artificiais, contendo as seis unidades experimentais hidratadas com água destilada e sob iluminação de mini refletores de LED.



Tabela A1 - Número de eclosões por grupo taxonômico nos tratamentos controle e com microalga.



Figura 3 – Número total de eclosões do zooplâncton ao longo do experimento nos tratamentos com microalga e controle.



Figura 4 – Número total de eclosões entre os tratamentos controle e com microalga.



Figura 5 – Número total de eclosões por amostragem entre os tratamentos controle e com microalga para cada reservatório.



Figura 6 – Riqueza de táxons ao longo do experimento nos tratamentos com microalga e controle.



Figura 7 – Riqueza de táxons acumulada entre os tratamentos controle e com microalga.



Figura 8 – Riqueza de táxons por amostragem entre os tratamentos controle e com microalga para cada reservatório.



Tabela A2 – Número de eclosões nos tratamentos controle (C) e com microalga (CM) entre os reservatórios.

CÓDIGO: SB0678

AUTOR: GUSTAVO CESAR BRITO DA SILVA

ORIENTADOR: RIVA DE PAULA OLIVEIRA

TÍTULO: Análise do efeito anti-apoptótico e neuroprotetor do óleo essencial de Lippia origanoides (OELO) no nematodo Caenorhabtidis elegans

Resumo

Este estudo apresenta os resultados parciais da investigação dos efeitos do óleo essencial de Lippia origanoides (OELO) sobre o sistema colinérgico de C. elegans. Devido a falhas técnicas no microscópio de fluorescência do laboratório, os ensaios previstos de apoptose e neuroproteção visual foram substituídos por análises neurofisiológicas de batimento faríngeo e quimiotaxia. Os resultados demonstram que o OELO inibe a acetilcolinesterase (AChE) de forma dose-dependente, reduzindo o batimento faríngeo em linhagens selvagens (N2), mas não em mutantes deficientes em AChE, confirmando a especificidade do alvo. Além disso, o tratamento prejudicou a consolidação da memória olfativa em ensaios de quimiotaxia, sugerindo um papel do óleo na plasticidade sináptica.

Palavras-chave: Lippia origanoides, Caenorhabditis elegans, Acetilcolinesterase.

TITLE: Analysis of the Anti-Apoptotic and Neuroprotective Effects of Lippia origanoides Essential Oil (OELO) in the Nematode Caenorhabditis elegans

Abstract

This study presents the preliminary results of an investigation into the effects of Lippia origanoides essential oil (OELO) on the cholinergic system of C. elegans. Due to technical issues with the laboratory's fluorescence microscope, the planned apoptosis and visual neuroprotection assays were replaced by neurophysiological analyses of pharyngeal pumping and chemotaxis. The results demonstrate that OELO inhibits acetylcholinesterase (AChE) in a dose-dependent manner, reducing pharyngeal pumping in wild-type (N2) strains, but not in AChE-deficient mutants, confirming target specificity. Furthermore, treatment impaired the consolidation of olfactory memory in chemotaxis assays, suggesting a role for the oil in synaptic plasticity.

Keywords: Lippia origanoides, Caenorhabditis elegans, Acetylcholinesterase.

Introdução

O óleo essencial de Lippia origanoides (alecrim-pimenta), planta medicinal usada na fitoterapia popular como antisséptico e analgésico, é rico em monoterpenos fenólicos (carvacrol e timol) com atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante já demonstradas in vivo. Mais recentemente, o interesse científico se voltou para sua capacidade de inibir a acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a acetilcolina na fenda sináptica, o mesmo mecanismo usado por fármacos como donepezila e galantamina no tratamento da Doença de Alzheimer. O projeto utiliza Caenorhabditis elegans como modelo, por sua simplicidade neuronal e alta conservação molecular com humanos. O laboratório já mostrou que o óleo aumenta a longevidade do verme e o protege contra a toxicidade do peptídeo β-amiloide. Como a acetilcolina regula funções essenciais como locomoção e batimento faríngeo, estudar a modulação da AChE é central para entender
os efeitos neurobiológicos do óleo. O plano original previa avaliar apoptose e danos neuronais por microscopia de fluorescência, mas problemas técnicos com o equipamento impediram essa análise. Por isso, o trabalho no período se concentrou em ensaios funcionais da via colinérgica: batimento faríngeo e quimiotaxia (como medida de plasticidade sináptica).

Metodologia

O presente estudo foi conduzido utilizando o nematoide Caenorhabditis
elegans como modelo experimental para avaliação dos efeitos neurofisiológicos do óleo essencial de Lippia origanoides (OELO). Foram utilizadas a cepa selvagem N2 (Bristol) e as linhagens mutantes deficientes em acetilcolinesterase (AChE) GG201, GG202 e PR946, além da linhagem transgênica CL2355, obtidas do Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Os animais foram mantidos em placas de meio Nematode Growth Medium (NGM) semeadas com Escherichia coli OP50, em estufa a 20 °C, seguindo protocolos padrão descritos por Brenner (1974).
Para obtenção de populações sincronizadas, foi empregada a técnica de lise alcalina com hipoclorito de sódio e NaOH, resultando na recuperação de ovos viáveis. O OELO, rico em carvacrol e timol, foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%) para obtenção das concentrações finais de 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL.
Para o ensaio de batimento faríngeo, animais sincronizados no estágio L4 das linhagens N2, GG201, GG202 e PR946 foram expostos ao OELO por 24 h, e a frequência de bombeamento faríngeo foi registrada sob estereomicroscópio, com três contagens independentes de 20 segundos para cada animal.
Já os ensaios de quimiotaxia e memória olfativa utilizaram a linhagem

CL2355, dividida em grupos "naïve" (sem condicionamento) e treinados, estes
últimos expostos ao odor de álcool isoamílico associado à ausência de alimento por 90 minutos. Após o tratamento com OELO por 24 h, o Índice de Quimiotaxia (CI) foi calculado com base na distribuição dos animais em placas de ensaio contendo o atrativo químico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica, e a análise estatística foi conduzida no software GraphPad Prism 6.0, utilizando ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos tratados e o controle (DMSO 0,1%), sendo consideradas estatisticamente significativas as diferenças com p < 0,05.

Resultados e Discussões

O OELO reduziu significativamente a frequência de batimento faríngeo na linhagem selvagem N2, efeito consistente com a inibição da atividade da AChE e o consequente acúmulo de acetilcolina na sinapse. Notavelmente, esse efeito não foi observado nas linhagens mutantes GG201, GG202 e PR946, deficientes em AChE, o que demonstra que a ação do óleo sobre o batimento faríngeo depende especificamente da presença funcional dessa enzima, reforçando a AChE como alvo molecular do OELO.
Nos ensaios de quimiotaxia, os animais "naïve" mantiveram padrão de locomoção normal em resposta ao atrativo, indicando ausência de efeitos tóxicos inespecíficos do óleo sobre a mobilidade ou quimiossensibilidade basal dos vermes. Já os animais treinados apresentaram redução no Índice de Quimiotaxia, particularmente na concentração de 1,0 mg/mL, sugerindo que a inibição da AChE promovida pelo OELO interfere na consolidação da memória olfativa associativa. Em conjunto, esses resultados apontam que o óleo essencial de Lippia origanoides modula funcionalmente a via colinérgica em C. elegans, afetando tanto processos comportamentais dependentes de AChE (batimento faríngeo) quanto processos cognitivos mais complexos, como a plasticidade sináptica envolvida na memória olfativa.

Conclusão

O OELO atua como um modulador colinérgico funcional em C. elegans. A resistência dos mutantes confirma a especificidade do alvo (AChE), enquanto os dados de quimiotaxia revelam impactos na plasticidade sináptica. Espera-se retomar os ensaios de fluorescência após o conserto do equipamento.

Referências

1. Aggarwal NT, Mielke MM. Sex Differences in Alzheimer's Disease. Neurologic Clinics. maio de 2023;41(2):343–58.
2. Chen SY, Gao Y, Sun JY, Meng XL, Yang D, Fan LH, et al. Traditional Chinese Medicine: Role in Reducing β-Amyloid, Apoptosis, Autophagy, Neuroinflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Dysfunction of Alzheimer's Disease. Front Pharmacol. 22 de abril de 2020;11:497.
3. Machado VS, Verdi CM, Somacal S, Rossi GG, Machado ML, Klein B, et al. Achyrocline flaccida essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on Caenorhabditis elegans, and antimycobacterial activity. Natural Product Research. 17 de dezembro de 2021;35(24):5899–903.
4. Fania A, Monaco A, Amoroso N, Bellantuono L, Cazzolla Gatti R, Firza N, et al. A Dementia mortality rates dataset in Italy (2012–2019). Sci Data. 25 de agosto de 2023;10(1):564.
5. Eisenmenger LB, Peret A, Famakin BM, Spahic A, Roberts GS, Bockholt JH, et al. Vascular contributions to Alzheimer's disease. Translational Research. abril de 2023;254:41–53.
6. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. J Prev Alz Dis. 2021;1–16.
7. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. Nat Rev Dis Primers. 13 de maio de 2021;7(1):33.
8. Ashrafian H, Zadeh EH, Khan RH. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. International Journal of Biological Macromolecules. janeiro de 2021;167:382–94.
9. Chen X, Drew J, Berney W, Lei W. Neuroprotective Natural Products for Alzheimer's Disease. Cells. 25 de maio de 2021;10(6):1309.
10. Rudnicka-Drożak E, Drożak P, Mizerski G, Zaborowski T, Ślusarska B, Nowicki G, et al. Links between COVID-19 and Alzheimer's Disease—What Do We Already Know? IJERPH. 25 de janeiro de 2023;20(3):2146.
11. Li W, Sun L, Yue L, Xiao S. Alzheimer's disease and COVID-19: Interactions, intrinsic linkages, and the role of immunoinflammatory responses in this process. Front Immunol. 9 de fevereiro de 2023;14:1120495.
12. Chen Y, Qin Q, Luo J, Dong Y, Lin C, Chen H, et al. Litchi flower essential oil balanced lipid metabolism through the regulation of DAF-2/IIS, MDT-15/SBP-1, and MDT-15/NHR-49 pathway. Front Nutr. 19 de outubro de 2022;9:934518.
13. Xia X, Wang Y, Zheng J. COVID-19 and Alzheimer's disease: how one crisis worsens the other. Transl Neurodegener. dezembro de 2021;10(1):15.
14. Hardan L, Filtchev D, Kassem R, Bourgi R, Lukomska-Szymanska M, Tarhini H, et al. COVID-19 and Alzheimer's Disease: A Literature Review. Medicina. 25 de outubro de 2021;57(11):1159.
15. Paschalidis M, Konstantyner TCRDO, Simon SS, Martins CB. Trends in mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2019. Epidemiol Serv Saúde. 2023;32(2):e2022886.
16. Jones EAK, Jenkins B, Addison C. Mortality Trends in Alzheimer's Disease in Mississippi, 2011–2021. Diseases. 11 de dezembro de 2023;11(4):179.
17. Meng W, Xie J, Yuan N, Liu P, Yang F, Jiang R, et al. Female perspective: the burden of Alzheimer's disease and other dementias in China from 1990 to 2019 and

prediction of their prevalence up to 2044. Front Public Health. 27 de abril de 2023;11:1101089.
18. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia.
19. Moniz AMH, Xavier Junior FH, Paiva WDS, Fernández IM, Martins RMG, Janebro DI, et al. Quimiotipos de Lippia origanoides Kunth na Amazonia e sua importância farmacológica: uma revisão. Cuad Ed Desar. 11 de dezembro de 2023;15(12):15619–71.
20. Milliken W. TRADITIONAL MEDICINES AMONGST INDIGENOUS GROUPS IN RORAIMA, BRAZIL: A RETROSPECTIVE. ethnoscientia. 21 de setembro de 2021;6(3):116.
21. De Almeida WS, De Lima SG, Barreto HM, Andrade LMDS, Fonseca L, Athayde Sobrinho C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Lippia lasiocalycina Cham. (Verbenaceae). Industrial Crops and Products. dezembro de 2018;125:236–40.
22. Oliveira DR, Leitão GG, Fernandes PD, Leitão SG. Ethnopharmacological studies of Lippia origanoides. Revista Brasileira de Farmacognosia. março de 2014;24(2):206–14.
23. Ferraz MPS, Costa JAS, Barros C, Costa N, de Novais JS, de Oliveira GL. PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO NORDESTE BRASILEIRO COM POTENCIAL FITOTERÁPICO: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. 2023;
24. Almeida MC, Pina ES, Hernandes C, Zingaretti SM, Taleb-Contini SH, Salimena FRG, et al. Genetic diversity and chemical variability of Lippia spp. (Verbenaceae). BMC Res Notes. dezembro de 2018;11(1):725.
25. Henrique Moniz AM, Xavier Junior FH, Melo Martins Silva G, Reis De Melo ACG, Silva MMCL, Paiva WS, et al. Lippia origanoides essential oil increases longevity and ameliorates β-amyloid peptide-induced toxicity in Caenorhabditis elegans. Natural Product Research. 2 de dezembro de 2023;1–9.
26. Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, et al. Caenorhabditis elegans: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. Toxicological Sciences. novembro de 2008;106(1):5–28.
27. Ma T, Tian X, Zhang B, Li M, Wang Y, Yang C, et al. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2. Nature. 3 de março de 2022;603(7899):159–65.
28. Liang JJH, McKinnon IA, Rankin CH. The contribution of C. elegans neurogenetics to understanding neurodegenerative diseases. Journal of Neurogenetics. 1o de outubro de 2020;34(3–4):527–48.
29. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. Nat Rev Drug Discov. maio de 2006;5(5):387–99.
30. Van Pelt KM, Truttmann MC. Caenorhabditis elegans as a model system for studying aging-associated neurodegenerative diseases. Translational Medicine of Aging. 2020;4:60–72.
31. Lanzerstorfer P, Sandner G, Pitsch J, Mascher B, Aumiller T, Weghuber J. Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative in vitro and in vivo systems. Arch Toxicol. fevereiro de 2021;95(2):673–91.
32. Zhang L, Gu B, Wang Y. Clove essential oil confers antioxidant activity and lifespan extension in C. elegans via the DAF-16/FOXO transcription factor. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. abril de 2021;242:108938.
33. Fuentes C, Verdú S, Fuentes A, Ruiz MJ, Barat JM. Effects of essential oil components exposure on biological parameters of Caenorhabditis elegans. Food and

Chemical Toxicology. janeiro de 2022;159:112763.
34. Hunt PR. The C. elegans model in toxicity testing. J of Applied Toxicology. janeiro de 2017;37(1):50–9.
35. Han Y, Song S, Guo Y, Zhang J, Ma E. ace-3 plays an important role in phoxim resistance in Caenorhabditis elegans. Ecotoxicology. maio de 2016;25(4):835–44.
36. Combes D, Fedon Y, Toutant J, Arpagaus M. Multiple ace genes encoding acetylcholinesterases of Caenorhabditis elegans have distinct tissue expression. Eur J of Neuroscience. agosto de 2003;18(3):497–512.
37. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. Brain. 1o de julho de 2018;141(7):1917–33.
38. Kumar A, Rueda E, Martínez J, Ocazionez R, Stashenko E. A pentacyclic triterpene from Lippia origanoides H.B.K and its cytotoxic activity. Phcog Mag. 2020;16(5):513.
39. Bhatt S, Puli L, Patil CR. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. Drug Discovery Today. março de 2021;26(3):794–803.
40. Falco AD, Cukierman DS, Hauser-Davis RA, Rey NA. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. Química Nova [Internet]. 2015 [citado 3 de julho de 2023]; Disponível em: http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150152
41. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules. 8 de dezembro de 2020;25(24):5789.

CÓDIGO: SB0698

AUTOR: VIVIANE TAINA CARVALHO DA SILVA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Análise histopatológica do front de invasão e prognóstico dos carcinomas epidermoides de palato quimicamente induzidos em ratos.

Resumo

A complexidade no entendimento dos inúmeros mecanismos que envolvem a carcinogênese oral demanda estudos detalhados para auxiliar no entendimento desse processo. Desta forma, a análise clínico-patológica do processo de evolução da carcinogênese oral induzida quimicamente, ajuda a entender não só o desenvolvimento, como também a gênese de possíveis alterações patológicas que podem acometer a cavidade oral. Diante disso, realizamos um estudo utilizando ratos da linhagem Wistar, animal que possui muita similaridade com o sistema humano, submetendo-o a um processo de indução de carcinogênese química. Sendo analisadas características clínicas, histopatológicas e histomorfométricas das diferentes etapas de desenvolvimento do carcinoma oral. Dessa forma, espera-se que os achados do presente projeto possam contribuir para a melhoria no entendimento do processo de carcinogênese do carcinoma epidermoide, futura atuação de biomarcadores e suas relações com prognóstico das lesões.

Palavras-chave: Carcinogênese. Carcinoma de Células Escamosas. Palato.

TITLE: Histopathological analysis of the invasive front and prognosis of chemically induced squamous cell carcinomas of the palate in rats.

Abstract

The complexity involved in understanding the numerous mechanisms underlying oral carcinogenesis requires detailed studies to improve our knowledge of this process. Thus, the clinicopathological analysis of the progression of chemically induced oral carcinogenesis contributes not only to understanding tumor development but also to elucidating the pathogenesis of possible pathological alterations that may affect the oral cavity. Therefore, we conducted a study using Wistar rats, an animal model that shares several similarities with the human system, subjected to a chemical carcinogenesis induction protocol. Clinical, histopathological, and histomorphometric characteristics of the different stages of oral carcinoma development were analyzed. Therefore, it is expected that the findings of the present study will contribute to a better understanding of

the carcinogenesis process of squamous cell carcinoma, as well as to future research on biomarkers and their association with lesion prognosis.

Keywords: Carcinogenesis. Squamous Cell. Palate.

Introdução

1. Introdução

No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte por doença, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Considerando a cavidade oral como uma das principais localizações do câncer, foram estimados 11.180 casos em homens e 4.010 em mulheres no Brasil em 2021. Em 2018, houve 1.975 casos de óbitos por carcinoma epidermoide em língua, onde 77% dos casos ocorreram em homens (DA SILVA SOUTO et al, 2023). O carcinoma epidermóide oral (CEO) tem origem nos tecidos epiteliais e os locais mais acometidos são borda lateral de língua, lábio inferior e assoalho oral. Entretanto, qualquer superfície oral pode ser afetada. Considerada uma doença predominantemente do sexo masculino, atinge principalmente indivíduos acima dos 45 anos de idade e leucodermas (NEVILLE et al, 2009). Sendo o carcinoma epidermoide de língua a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, com taxas estimadas de sobrevida familiar em 5 e 10 anos são de 65,8% e 57,6%, respectivamente (DANG et al, 2023). Contudo, o palato representa uma das localizações mais raras para o carcinoma epidermoide, eles estão entre as neoplasias locais mais agressivas, deixando para trás importantes deficiências morfofuncionais (PATRU et al, 2020). Frente à importância do entendimento do processo de carcinogênese oral, objetivando contribuir na melhoria das condições de tratamento e prognóstico dos pacientes acometidos por esta enfermidade, o presente trabalho tem por objetivo analisar a histopatologia dos carcinomas epidermoides de palato mole e duro, em particular o front de invasão neoplásico e correlacionar com a profundidade de invasão tumoral.

Metodologia

2. Método

2.1. Caracterização do Estudo

Esta pesquisa consiste em uma análise clínica descritiva e comparativa dos carcinomas epidermoides orais de palato duro e mole, quimicamente induzidos pelo 4-NQO em ratos e a mensuração de extensão através da morfometria.

2.2. Amostra

Foram utilizados 50 ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 200-250 g, oriundos do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, onde ficaram 3 ou 4 animais por gaiola, submetidos a condições controladas de temperatura (24±2 °C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro) e receberam ração e água ad libitum. O peso de cada animal foi aferido a cada 7 dias, o consumo de água e ração por gaiola foi averiguado todos os dias ao longo das 37 semanas experimentais. O protocolo experimental foi submetido a análise da Comissão

de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
A amostra foi constituída por 50 ratos Wistar machos adultos, sendo 10 ratos constituindo o grupo controle (GC), e 40 ratos que constituíram o grupo experimental por um tempo máximo de 37 semanas, nesse grupo foi diluído na água presente no bebedouro o agente carcinógeno 4-NQO (SUPSAVHAD et al, 2016), após esse período foram sacrificados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 5% e xilazina 2% (0,3ml/100g). As lesões da cavidade oral foram coletadas, fotografadas e medidas para a análise macroscópica. Em seguida, foram imersas em formaldeído a 10%, emblocadas em parafina e seccionadas em micrótomo para posterior análise histopatológica e histomorfométrica.

2.4. Análise histopatológica das lesões induzidas quimicamente

A análise histopatológica foi realizada confirmando a presença do carcinoma epidermoide de palato duro e mole. Além disso, foi realizada a análise do front de invasão tumoral e análise histomorfométrica com a mensuração da profundidade de invasão tumoral, relacionadas ao processo de indução química da carcinogênese oral em ratos. As lâminas obtidas foram analisadas em microscopia óptica (Microscópio OPTIKA-Italy) e fotografadas usando o sistema da captura de imagem com câmera acoplada da marca OPTIKA-Italy, sendo realizada a análise dos padrões histopatológicos do front de invasão, assim como mensuração da profundidade de invasão neoplásica.

2.6. Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados coletados foram armazenados em planilha específica do Excel (Microsoft Windows) e transportados para o programa estatístico SPSS 20.0 (IBM), em que utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnoff para verificar a normalidade ou não dos dados obtidos. Nos casos em que os dados não foram paramétricos, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis (KW), em caso de dados paramétricos, utilizamos o teste ANOVA (F) e para a verificação de possíveis correlações utilizamos o teste de correlação de Spearman.

2.7. Implicações Éticas

O presente trabalho pertence ao projeto aprovado no Edital Universal do CNP 2021 (nº 409414/2021-2) intitulado “Estudo clínico patológico e imunohistoquímico da evolução de carcinomas epidermoides orais induzidos quimicamente em ratos” e foi submetido à apreciação de seu conteúdo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), recebendo o número 051/2022.

Resultados e Discussões

3. Resultados

3.1. Modo de invasão

Na análise do modo de invasão, foi observado que o padrão de invasão predominante foi o bem definido, representando 79,5% dos 44 casos analisados. Já o padrão mal

definido teve uma frequência menor nas lâminas analisadas, estando presente em 9 casos (Tabela 1/ Figura 1).

3.2. Padrão histológico de invasão

Na análise do padrão histológico de invasão, foi observado que, dos 44 casos, 19 casos apresentaram invasão em ninhos ou ilhas (43,2% do total), sendo o padrão histológico de invasão com maior frequência. O segundo padrão com maior frequência foi a invasão por células isoladas (27,3% do total), seguido do padrão em cordões de células (15,9% do total) e do padrão em ninhos e cordões de células (13,6 % do total) representando o padrão histológico de invasão menos prevalente (Tabela 2/ Figura 2).

3.3. Invasão perivascular

Como mostrado na tabela 3, a invasão perivascular estava presente em 68,2% dos casos (30 casos) (Figura 2).

3.4. Invasão perineural

Na análise da invasão perineural, foi observado que em 25% dos casos (11 casos) estava presente a invasão perineural (Tabela 4).

3.5. Invasão glandular

Na análise da invasão glandular, foi observado que em 43,2% dos casos (19 casos) a invasão glandular estava ausente. A invasão na porção ducal estava presente em 20,5 dos casos (9 casos), na porção secretora foi de 18,2% dos casos (8 casos). Já a invasão tanto na porção secretora quanto na ductal foi em 18,2% dos casos (8 casos) (Tabela 5/ Figura 3).

3.6. Invasão muscular

Como mostrado na tabela 6, a invasão muscular estava ausente na maior parte dos casos, sendo ausente em 90,9% dos casos (40 casos) (Figura 3).

3.7. Teste de normalidade e teste não paramétrico de Krushal-Wallis (KW)

A Tabela 7 apresenta os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para as variáveis analisadas. O valor de significância foi de $p < 0,001$ para todas as 5 variáveis, em ambos os testes. Dessa forma, como todos os valores de p foram inferiores a 0,05, mostrando uma distribuição não normal dos dados e, assim, foi necessária a utilização do teste estatístico não paramétrico de Krushal-Wallis (KW) (Tabela 8). Foi observado que o grupo com front mal definido apresentou valores maiores em todas as variáveis analisadas (Tabela 8). Como mostrado na tabela 9, foram encontradas diferenças significativas para invasão perivascular ($p = 0,023$), invasão perineural ($p = 0,019$) e invasão muscular ($p < 0,001$).

4. Discussão

Os casos de tumores na região de cabeça e pescoço correspondem a 5% de todos os casos de tumores, sendo metade desses casos especificamente na cavidade oral (KIM et al, 2024). O câncer de cavidade oral é uma das neoplasias malignas mais comuns e agressivas, tendo morbidade e mortalidade significativas e acometendo principalmente a língua, palato duro, assoalho de boca, gengiva e mucosa jugal (CHEN et al, 2026). Embora a incidência do carcinoma de células escamosas (CCE) no palato seja menor do que em outros locais, o CCE continua sendo a lesão maligna mais comum no palato duro, representando 2% de todos os CCEs de cabeça e pescoço, com predileção por pacientes do sexo masculino na sexta década de vida (YOUNG et al, 2026). A distribuição geográfica e prevalência do câncer de boca sofre grandes variações entre as diferentes populações (SARODE et al., 2020). No cenário da saúde pública brasileira, o diagnóstico tardio do câncer de boca é uma realidade, ocorrendo, geralmente, quando as lesões estão nos estágios T3 ou T4 (KOWALSKI et al, 2022). Além disso, características individuais como sexo, local da lesão, aspecto clínico e diagnóstico

histopatológico podem variar de acordo com hábitos culturais e diferenças regionais (DAROIT et al., 2023). Dentre as regiões acometidas, o palato representa uma das localizações mais raras para o carcinoma epidermoide e está entre as neoplasias locais mais agressivas (PATRU et al, 2020).

O presente estudo analisou as características histopatológicas do front de invasão e sua correlação com o comportamento invasivo dos carcinomas epidermoides de palato quimicamente induzidos em ratos. Foram avaliados o modo de invasão, o padrão histológico de invasão e a presença de invasão perivascular, perineural, muscular e glandular. Entre os achados, observou-se predomínio do modo de invasão bem definido (79,5%), enquanto o padrão histológico mais frequente foi o de ninhos ou ilhas (43,2%), seguido por células isoladas (27,3%), cordões (15,9%) e pela associação de ninhos e cordões (13,6%). A invasão perivascular esteve presente na maioria dos casos (68,2%), assim como a invasão glandular, considerando o comprometimento das porções ductal e secretora (56,8%). Em contrapartida, a invasão perineural (25,0%) e a invasão muscular (9,1%) apresentaram menor frequência na amostra analisada. A invasão perineural, invasão neoplásica de nervos, é um achado patológico comum no câncer de cabeça e pescoço, sendo associado a piores desfechos clínicos (BAKST et al, 2018). Nas análises dos dados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), foi observado que o front de invasão mal definido esteve principalmente relacionado às invasões muscular, perineural e perivascular, características que estão associadas a um maior potencial de agressividade local do carcinoma epidermoide do palato.

Conclusão

5. Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos com a análise histopatológica do front de invasão do carcinoma epidermoide de palato induzido quimicamente com o agente carcinógeno 4NQO em ratos, foi observado que o front de invasão mal definido esteve principalmente relacionado às invasões muscular, perineural e perivascular, características que estão associadas a um maior potencial de agressividade local do carcinoma epidermoide do palato. Esses achados reforçam a importância da avaliação do front de invasão na compreensão do comportamento biológico do carcinoma epidermoide de palato.

Referências

BHOLA R, NARWAL A, KAMBOJ M, DEVI A, ANAND R, CHATTERJEE S. Histopathological evaluation of minor salivary gland aberrations in oral squamous cell carcinoma. J Cancer Res Ther. 2023 Jan-Mar;19(2):299-303. doi: 10.4103/jcrt.jcrt_1832_21.

BAKST, Richard L.; GLASTONBURY, Christine M.; PARVATHANENI, Upendra; KATABI, Nora; HU, Kenneth S.; YOM, Sue S. Perineural invasion and perineural tumor spread in head and neck cancer. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, v. 103, n. 5, p. 1109-1124, 2019. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2018.12.009.

BRYNE M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Dis. 1998 Jun;4(2):70-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.1998.tb00260.x. PMID: 9680893.
DANG RR, KIM J, QURESHI MM, FAZELI SR, ZHAO Q, NOONAN VL, SUNDARARAJAN D, SALAMA A, TRUONG MT. Impact of depth of invasion on local recurrence in R0 resected node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. Head Neck. 2023 Mar;45(3):561-566. doi: 10.1002/hed.27264.
HAY AJ, MIGLIACCI J, KARASSAWA ZANONI D, MCGILL M, PATEL S, GANLY I. Minor salivary gland tumors of the head and neck-Memorial Sloan Kettering experience: Incidence and outcomes by site and histological type. Cancer. 2019 Oct 1;125(19):3354-3366. doi: 10.1002/cncr.32208.
PARK SI, PARK W, CHOI S, JANG Y, KIM H, KIM SH, NOH JM, CHUNG MK, SON YI, BAEK CH, JEONG HS. Clinical Outcome of Minor Salivary Gland Cancers in the Oral Cavity: A Comparative Analysis With Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. Front Oncol. 2020 Jun 3;10:881. doi: 10.3389/fonc.2020.00881.
VERED M, DANIEL N, HIRSHBERG A, DAYAN D. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. Oral Oncol. 2003 Jul;39(5):491-6. doi: 10.1016/s1368-8375(03)00011-3.
SPEIGHT PM. Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. Head Neck Pathol. 2007 Sep;1(1):55-60. doi: 10.1007/s12105-007-0010-9. Epub 2007 Nov 30. PMID: 20614283; PMCID: PMC2807502.
CUFFARI L, TESSEROLI DE SIQUEIRA JT, NEMR K, RAPAPORT A. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics. 2006;102(1):56–61
FAN KH, WANG HM, KANG CJ, LEE LY, HUANG SF, LIN CY, CHEN EYC, CHEN IH, LIAO CT, CHANG JTC. Treatment Results of Postoperative Radiotherapy on Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Coexistence of Multiple Minor Risk Factors Results in Higher Recurrence Rates. International Journal of Radiation Oncology. Biology. Physics. 2010; 77(4): 1024-1029. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.06.064. INCA. Incidência de câncer no Brasil. 2018. Disponível em: . Acesso em: 02 jul. 2021.
KREPPEL M, NAZARLI P, GRANDOCH A, SAFI AF, ZIRK M, NICKENIG HJ, SCHEER M, ROTHAMEL D, HELLMICH M, ZÖLLER JE. Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma - Comparison of the prognostic significance. Oral Oncology. 2016; 60:68-73. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.07.004.
KOWALSKI, Luan Nathiel Santana et al. Prognostic factors from squamous cell carcinoma of the hard palate, gingiva and upper alveolar ridge. Brazilian Oral Research, v. 36, e058, 2022. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0058.
Kim MJ, Ahn KM. Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma: the importance of recurrence and pTNM stage. Maxillofac Plast Reconstr Surg. 2024 Mar 4;46(1):8. doi: 10.1186/s40902-024-00410-3. PMID: 38433140; PMCID: PMC10909804.
LUNA-ORTIZ K, GÜEMES-MEZA A, VILLAVICENCIO-VALENCIA V, MOSQUEDA-TAYLOR A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. Oral Oncol. 2004 Nov;40(10):992-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.04.013.
NI Y, YAP T, SILKE N, SILKE J, MCCULLOUGH M, CELENTANO A, O'REILLY LA. Loss of NF-kB1 and c-Rel accelerates oral carcinogenesis in mice. Oral Diseases. 2021; 27:168–172.

PĂTRU A, ŞURLIN V, MĂRGĂRITESCU C, CIUCĂ EM, MATEI M, ŞERBĂNESCU MS, CAMEN A. Analysis of the distribution and expression of some tumor invasiveness markers in palate squamous cell carcinomas. Rom J Morphol Embryol. 2020 Oct-Dec;61(4):1259-1278. doi: 10.47162/RJME.61.4.27.
REYES M, FLORES T, BETANCUR D, PEÑA-OYARZÚN D , TORRES,VA. Wnt/β-Catenin Signaling in Oral Carcinogenesis. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21: 4682. doi:10.3390/ijms21134682.
RIVERA C. Essentials of oral cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2015;1;8(9):11884-11894.
SAWANT S, DONGRE H, KANOJIA D, JAMGHARE S, BORGES A, VAIDYA M. Role of Electron Microscopy in Early Detection of Altered Epithelium During Experimental Oral Carcinogenesis. Microscopy and Microanalysis. 2019; 25: 1367–1375. https://doi.org/10.1017/S1431927619000229.
SHANTI RM, O'MALLEY BW Jr. Surgical Management of Oral Cancer. Dental Clinics of North America. 2018; 62(1):77-86. https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.005.
SLOAN P, GALE N, HUNTER K et al. Malignant surface epithelial tumours: Squamous cell carcinoma. In: El-NAGGAR AK, CHAN JKC, GRANDIS JR, TAKATA T, SLOOTWEG PJ. WHO classification of tumours of the head and neck. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017. p.109-110
DA SILVA SOUTO AC, VIEIRA HEIMLICH F, LIMA DE OLIVEIRA L, BERGMANN A, DIAS FL, SPÍNDOLA ANTUNES H, DE MELO AC, THULER LCS, COHEN GOLDEMBERG D. Epidemiology of tongue squamous cell carcinoma: A retrospective cohort study. Oral Dis. 2023 Mar;29(2):402-410. doi: 10.1111/odi.13897.
SUPSAVHAD W, WESSEL P. DIRKSEN WP, MARTIN CK, ROSOL TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. The Veterinary Journal. 2016; 210: 7–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.006.
SUR S, STEELE R, AURORA R, VARVARES M, SCHWETYE KE, RAY RB. Bitter Melon prevents the development of 4-NQO-induced oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent mouse model by modulating immune signalling. Cancer Prevention Research. 2018; 11(4): 191–202. https://doi.org/10.1158/1940- 6207.
VIJAYAKUMAR G, SHARMA G, NARWAL A, KAMBOJ M. Broder versus Bryne's histologic grading parameters on incision biopsy specimens: A comparative study with P53 and KI67 expression. J Oral Maxillofac Pathol. 2021 Jan-Apr;25(1):55-60. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_328_20.
Young A, Okuyemi OT. Malignant Tumors of the Palate. [Updated 2023 Jan 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan-. Available from: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez18.periodicos.capes.gov.br/books/NBK564515/

Anexos



Tabela 1 - modo de invasão



Tabela 2 - Padrão histológico de invasão



Tabela 3 - Invasão perivascular



Tabela 4 - Invasão perineural



Tabela 5 - Invasão glandular



Tabela 6 - Invasão muscular



Tabela 7 - Teste de normalidade



Tabela 8 - Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis



Tabela 9 - Estatísticas do teste



Figura 1 - Fotomicrografia do modo de invasão tumoral / Figura 1: a. Padrão de invasão mal definido; b. Padrão de invasão bem definido.



Figura 2. Fotomicrografia da invasão perineural e perivascular / Figura 2: c. Seta amarela - Área de invasão perivascular; d. Seta amarela - invasão perineural/ Estrela preta - Nervo em corte longitudinal.



Figura 3. Fotomicrografia da invasão glandular e da invasão muscular / Figura 3: e. Seta amarela - invasão em glândulas salivares menores do palato; f. Seta amarela - Área de invasão muscular

CÓDIGO: SB0702

AUTOR: VICTOR MANOEL DA SILVA DIAS

ORIENTADOR: RENATA FIGUEIREDO ANOMAL

TÍTULO: O Estresse Oxidativo no Período Crítico do Desenvolvimento Pós-natal e o Comportamento de Sociabilidade em Roedores Modelo de Autismo

Resumo

Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por um nível variável de comprometimento na comunicação e interação social. Apesar de ser bastante estudada, a etiologia desse transtorno ainda não foi consistentemente explicada. Uma considerável quantidade de estudos associa o TEA a um conjunto de alterações no córtex sensorial durante seu desenvolvimento. Assim, a investigação a respeito da neurobiologia do autismo também consiste em explorar o desenvolvimento de áreas sensoriais durante o período crítico dos córtices correspondentes. Porém, a relação entre estresse oxidativo, o período crítico do córtex auditivo e o comportamento social autístico ainda não é bem conhecida. Abordagens que preencham essas lacunas são importantes para possibilitar intervenções que reduzam os comprometimentos da comunicação e interação social nos indivíduos diagnosticados com TEA. Esse projeto objetivou, então, investigar se os déficits sociais de roedores modelo de autismo (por injeção de ácido valpróico) também seriam acarretados pelo estresse oxidativo durante o período crítico do córtex auditivo primário. Para isso, os animais foram submetidos ao teste de sociabilidade na caixa das 3 câmaras, de modo a permitir comparações entre aqueles tratados com um antioxidante durante o período crítico do córtex e os não tratados. Os resultados parciais apontaram para uma possível melhoria no comportamento de sociabilidade do grupo que recebeu o antioxidante.

Palavras-chave: Autismo. Córtex auditivo. Estresse oxidativo. Sociabilidade.

TITLE: Oxidative Stress During the Critical Period of Postnatal Development and Sociability Behavior in Rodent Models of Autism

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by varying degrees of impairment in communication and social interaction. Despite extensive study, the etiology of this disorder has not yet been consistently explained. A number of studies link ASD to a set of alterations in the sensory cortex during its development. Consequently, research into the neurobiology of autism involves exploring the development of sensory areas during the critical period of the corresponding cortical

regions. However, the relationship between oxidative stress, the critical period of the auditory cortex, and autistic social behavior remains poorly understood. Approaches that address these gaps are crucial for enabling interventions to reduce communication and social interaction impairments in subjects with ASD. This project therefore aimed to investigate whether social deficits in a rodent model of autism (induced by valproic acid injection) might also stem from oxidative stress during the critical period of the primary auditory cortex. To this end, the animals underwent a three-chamber sociability test, allowing for comparisons between those treated with an antioxidant during the cortical critical period and those that were untreated. Preliminary results indicated a possible improvement in the sociability behavior of the group that received the antioxidant.

Keywords: Autism. Auditory cortex. Oxidative stress. Sociability.

Introdução

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por um nível variável de comprometimento na comunicação e interação social, bem como interesses e comportamentos restritos e repetitivos, o que resulta em uma menor capacidade de estabelecer um contato social típico com outras pessoas (Baird et al., 2003; Kanner, 1943). Apesar de ser bastante estudada, a etiologia do autismo ainda não foi consistentemente explicada. Na tentativa de contribuir para o entendimento dessa etiologia, uma considerável quantidade de estudos associa o TEA a um conjunto de alterações no córtex sensorial durante seu desenvolvimento, tendo em vista que anormalidades na percepção sensorial são encontradas em pessoas autistas com frequência (Robertson; Baron-Cohen, 2017; Rosenhall et al., 1999). Deste modo, o foco dessas investigações se volta para o período crítico do neurodesenvolvimento de áreas sensoriais.

O período crítico do neurodesenvolvimento consiste numa fase em que o sistema nervoso é altamente suscetível aos estímulos ambientais (Berardi et al., 2003; Begum et al., 2017). Assim, as influências ambientais durante o período crítico impactam a percepção sensorial na vida adulta. Há evidências consideráveis de que o progresso do período crítico do desenvolvimento pós-natal estaria sendo prejudicado devido a um efeito negativo do desequilíbrio entre estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidantes sobre os interneurônios e a rede perineuronal (Cheng et al., 2017). No entanto, a relação entre o estresse oxidativo, o período crítico do desenvolvimento do córtex auditivo e o comportamento social autístico ainda não é bem conhecida. Para fins de investigar relações dessa natureza, pode-se então recorrer a roedores modelo de autismo, que permitem o estudo das dimensões comportamental, morfológica e fisiológica dos transtornos de neurodesenvolvimento. O modelo roedor de autismo utilizado em nosso estudo envolve a administração de ácido valpróico (VPA) durante o desenvolvimento embrionário de ratos ou camundongos, visando induzir comportamentos autísticos, tendo sido iniciado por Rodier et al. (1996). Em roedores, foi constatado que a administração de VPA por volta do dia embrionário 12 (E12) está associada às alterações neurais e comportamentais do autismo, por estar relacionada ao dia de fechamento do tubo neural (Kataoka et al., 2013; Schneider; Przewłocki, 2005). Larner et al. (2021) destacam que a dose típica para indução do modelo de autismo é de 500 ou 600 mg/kg.

Utilizando o modelo VPA para estudar o mapa tonotópico, observou-se que tanto o gradiente tonotópico quanto os campos receptores estavam alterados, alterações típicas de quando ocorrem problemas na abertura e fechamento do período crítico de A1 (Anomal et al., 2013; Zhou et al., 2011). Esse achado sugere que alterações sensoriais presentes em roedores VPA são justamente aquelas derivadas de prejuízos no córtex auditivo. Contudo, permanece uma lacuna na relação entre córtices auditivos alterados por estresse oxidativo durante seu período crítico do desenvolvimento e o comportamento social deficitário nos roedores VPA. Para esclarecer essa relação, é essencial analisar o comportamento do modelo de roedor de autismo supramencionado, especialmente no teste de sociabilidade das 3 câmaras (Crawley, 2007). Tais abordagens científicas possibilitam intervenções que reduzam os comprometimentos da comunicação e interação social nos indivíduos diagnosticados com TEA.

O projeto objetivou então avaliar, por meio do teste de sociabilidade, o comportamento social de roedores modelo VPA de autismo tratados com antioxidante durante o período crítico do desenvolvimento do córtex auditivo primário, considerando a hipótese de que os déficits sociais observados no autismo podem ser relacionados ao estresse oxidativo aumentado durante o desenvolvimento dessa região sensorial.

Metodologia

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, explicativa e experimental. Foram utilizados indivíduos da espécie Rattus norvegicus (linhagem Wistar) (CEUA 035/2025), mantidos em gaiolas em uma sala no Biotério da Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, com temperatura, alimentação e umidade controladas. Os ratos utilizados no experimento foram induzidos a apresentar fenótipo comportamental autístico através de exposição embrionária ao ácido valpróico, cuja dose foi de 500 mg/kg, dissolvida em NaCl 0,15 M i.p. O grupo controle recebeu o mesmo volume de solução de veículo (NaCl 0,15 M i.p). A dose foi injetada no dia embrionário 12 (E12). Os testes foram realizados com três grupos experimentais: (1) ratos controles que não foram expostos ao ácido valpróico, ou seja, que não são modelo VPA de autismo - um grupo com 8 animais; (2) ratos modelo VPA de autismo tratados com exossomos sem antioxidante - um grupo com 5 animais; (3) ratos modelo modelo VPA de autismo tratados com exossomos com antioxidante em dosagem de 4 mg/kg - um grupo de 3 indivíduos. O antioxidante utilizado foi o extrato do fruto da planta Libidibia ferrea, que contém antioxidantes flavonóides. No caso dos grupos 2 e 3, os exossomos foram administrados por 3 dias consecutivos, os dias pós-natal 10, 11 e 12 (P10, P11 e P12), considerando o período crítico do córtex auditivo primário para formação tonotópica de P11 e P13 (de Villers-Sidani et al., 2007) e o período entre o início de 1h e o término da liberação do antioxidante pelo exossomo de 24 horas (Choi et al., 2022).

Os animais foram analisados a partir do P30. Para isso, utilizou-se uma caixa de 3 câmaras, para aplicação do teste de sociabilidade. O aparato utilizado para o teste era uma caixa retangular de acrílico na cor preta e composta por 3 câmaras, com abertura entre elas. Neste teste, o rato era exposto a um rato conhecido em uma gaiola cilíndrica de acrílico localizada na câmara direita e uma gaiola acrílica vazia da câmara esquerda (objeto). A câmara central não apresentava nenhum rato nem gaiola. No dia anterior ao experimento, os ratos eram levados à sala do experimento por 30 minutos em suas gaiolas, para depois passarem pelo processo de habituação. A habituação consistiu em duas

sessões de 5 minutos para cada rato explorar o aparato. No dia seguinte, após 30 minutos na gaiola dentro da sala, cada rato realizou uma sessão de 10 minutos do teste de sociabilidade. Entre as sessões de cada rato, a caixa foi limpa utilizando álcool 10% e papel toalha. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera e os vídeos foram organizados e analisados pelo software XploRat. Os dados brutos obtidos, referentes ao tempo passado pelos roedores em cada câmara da caixa e o tempo de aproximação de cada estímulo, foram submetidos a uma análise estatística pelo software Prism.

Após o experimento, os animais foram eutanasiados. Alguns deles passaram por perfusão transcardíaca, seguida pela retirada do cérebro para posterior análise. Tal procedimento de perfusão e eutanásia fez uso de injeção de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), por via intraperitoneal, e secção do diafragma.

Resultados e Discussões

No presente projeto de pesquisa, o comportamento social de 8 ratos controles e 3 ratos modelos de autismo tratados com antioxidante (VPAoxi) no período crítico do córtex auditivo primário foi analisados no teste de sociabilidade.

A análise estatística apontou uma diferença significativa entre o tempo de permanência por minuto dentro da câmara direita em comparação com as demais câmaras no grupo controle (Figura 1, $p< 0.05$). Os ratos do grupo controle passaram mais tempo na câmara direita, contendo o estímulo social (outro rato), do que na câmara esquerda (com gaiola e sem rato) e na câmara central vazia ($p< 0.05$). Se assemelhando ao comportamento do grupo controle, os ratos VPA tratados com antioxidante (VPAoxi) (Figura 1) também passaram mais tempo na câmara direita do que nas demais câmaras, embora sem diferença estatisticamente significativa.

Com relação ao tempo de aproximação (Figura 2), interação com os demais ratos, tanto o grupo controle como o grupo VPAoxi apresentaram maior tempo explorando o estímulo social (rato conhecido) na câmara direita em relação à câmara esquerda (com objeto e sem rato) e a câmara central vazia ($p< 0.05$).

De acordo com a literatura, roedores controle (sem tratamento) apresentam preferência sociável, permanecendo mais tempo em câmaras contendo coespecíficos do que naquelas com objetos (Rein et al., 2020; Jabarin et al., 2022; Wells et al., 2026). Em contrapartida, em modelos animais de autismo, esse padrão comportamental tende a se inverter, havendo uma preferência pela exploração de câmaras vazias ou contendo objetos inanimados (Rein et al., 2020; Jabarin et al., 2022; Wells et al., 2026). Em nosso estudo, os ratos Wistar do modelo de autismo tratados demonstraram um padrão de exploração social semelhante ao do grupo controle. Esse resultado sugere um potencial efeito protetor/resgate do antioxidante administrado durante o desenvolvimento do córtex auditivo primário sobre o comportamento social nesses animais. No entanto, para ratificar se esse benefício é atribuível especificamente ao composto antioxidante, nitidamente faz-se necessário expandir o tamanho amostral do grupo VPA tratado com antioxidante e incluir no delineamento os grupos experimentais VPA sem tratamento e VPA tratado apenas com exossomos (sem o ativo antioxidante).

Conclusão

A partir dos resultados parciais desta pesquisa, ficou demonstrado que os roedores do modelo de autismo expostos ao tratamento com antioxidante durante o período crítico de desenvolvimento do córtex auditivo primário apresentam um perfil comportamental social semelhante ao do grupo controle. Apesar de o estágio atual da nossa pesquisa não permitir a confirmação definitiva desses achados — dada a necessidade de ampliação amostral e inclusão dos grupos de controle do veículo — os dados preliminares apontam para um promissor efeito terapêutico da intervenção antioxidante no resgate de déficits sociais associados ao autismo.

Referências

ANOMAL, R. F.; DE VILLERS-SIDANI, E.; MERZENICH, M. M.; PANIZZUTTI, R. Manipulation of BDNF signaling during critical period affect the tonotopic organization and receptive fields of the primary auditory cortex after pure tone exposition. PLOS ONE, v. 8, n. 5, e64208, 2013.

BAIRD, G.; CASS, H.; SLONIMS, V. Diagnosis of autism. BMJ, v. 327, n. 7413, p. 488–493, 30 ago. 2003.

BEGUM, M. R.; SNG, J. C. G. Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. Journal of Neurochemistry, v. 142, n. 5, p. 649–661, 2017.

BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; MAFFEI, L. Critical periods during sensory development. Current Opinion in Neurobiology, v. 10, p. 138–145, 2000.

BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; RATTO, G. M.; MAFFEI, L. Molecular basis of plasticity in visual cortex. Trends in Neurosciences, v. 26, p. 369–378, 2003.

CHENG, S. B.; LIU, H. T.; CHEN, S. Y.; LIN, P. T.; LAI, C. Y.; HUANG, Y. C. Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. PLOS ONE, v. 12, n. 1, e0170016, 2017.

CHOI, H.; KIM, M. Y.; KIM, D. H.; YUN, H.; OH, B. K.; KIM, S. B.; SONG, I. H.; PARK, H. S.; KIM, S. E.; PARK, C.; et al. Quantitative biodistribution and pharmacokinetics study of GMP-grade exosomes labeled with 89Zr radioisotope in mice and rats. Pharmaceutics, v. 14, n. 6, 1118, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061118.

CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. Brain Pathology, v. 17, n. 4, p. 448–459, 2007.

JABARIN, R.; NETSER, S.; WAGNER, S. Beyond the three-chamber test: toward a multimodal and objective assessment of social behavior in rodents. Molecular Autism, v. 13, art. 45, 2022. DOI: 10.1186/s13229-022-00521-6. Acesso em: 30 ago. 2026.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. The Nervous Child, New York, v. 2, p. 217–250, 1943.

KATAOKA, S.; TAKUMA, K.; KINOSHITA, C.; KAKIMOTO, K.; KIM, H.-J.; KOBAYASHI, M.; et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 16, n. 1, p. 91–103, 2013.

LARNER, O.; ROBERTS, J.; TWISS, J.; FREEMAN, L. A need for consistency in behavioral phenotyping for ASD: analysis of the valproic acid model. Autism Research and Treatment, v. 2021, art. 8863256, 2021. DOI: 10.1155/2021/8863256.

REIN, B.; MA, K.; YAN, Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. Nature Protocols, v. 15, n. 10, p. 3464–3477, 2020. DOI: 10.1038/s41596-020-0382-9. Acesso em: 30 ago. 2026.

ROBERTSON, C. E.; BARON-COHEN, S. Sensory perception in autism. Nature Reviews Neuroscience, v. 18, n. 11, p. 671–684, 2017.
RODIER, P. M.; INGRAM, J. L.; TISDALE, B.; NELSON, S.; ROMANO, J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. The Journal of Comparative Neurology, v. 370, n. 2, p. 247–261, 24 jun. 1996.

ROSENHALL, U.; NORDIN, V.; SANDSTROM, M.; AHLSEN, G.; GILLBERG, C. Autism and hearing loss. Journal of Autism and Developmental Disorders, v. 29, p. 349–357, 1999.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. Neuropsychopharmacology, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

WELLS, C.; HUDDLESTON, K. P.; BROWN, S.; RAZZAQ, F.; CHICK, D.; ROGERS, T. D. Novel behavioral tasks for the measurement of social motivation in mice: a comparison across strains. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 19, art. 1678147, 2026. DOI: 10.3389/fnbeh.2025.1678147. Acesso em: 30 ago. 2026.

ZHOU, X.; PANIZZUTTI, R.; DE VILLERS-SIDANI, E.; MADEIRA, C.; MERZENICH, M. M. Natural restoration of critical period plasticity in the juvenile and adult primary auditory cortex. The Journal of Neuroscience, v. 31, n. 15, p. 5625–5634, 2011.

Anexos



Figura 1. Tempo de permanência por minuto nas câmaras. Fonte: autoria própria.



Figura 2. Tempo de exploração do animal ou objeto. Fonte: autoria própria.

CÓDIGO: SB0704

AUTOR: GABRIELA ARAUJO DE SALES LEITE

ORIENTADOR: VIVIANE SOUZA DO AMARAL

TÍTULO: Avaliação do impacto biopsicossocial das cardiopatias congênitas na dinâmica familiar de crianças atendidas no estado do Rio Grande do Norte.

Resumo

As cardiopatias congênitas (CC) são as anomalias estruturais mais frequentes ao nascimento e apresentam relevância no Rio Grande do Norte, onde há alta prevalência de consanguinidade, fator associado ao aumento de doenças genéticas. Este estudo teve como objetivo investigar o impacto biopsicossocial das CC na dinâmica familiar de crianças atendidas em serviço de referência em cirurgias cardíacas pediátricas. Trata-se de estudo observacional, analítico, de corte transversal, com abordagem mista, utilizando dados de 2018 a 2022 e questionários semiestruturados aplicados aos responsáveis. Foram avaliados aspectos psicológicos, sociais e econômicos relacionados ao diagnóstico, tratamento e dificuldades cotidianas. Entre 81 cuidadores, a presença de rede de apoio adequada associou-se a um menor impacto familiar, com mediana de 43 pontos na Pontuação Total do Impact on Family Scale (IFS), versus 29 entre aqueles sem rede de apoio ($p<0,001$). A presença paterna no domicílio também esteve associada à menor impacto (42 versus 30; $p<0,001$), enquanto cardiopatia paliativa ou concomitância com diagnóstico sindrômico e/ou doença crônica relacionou-se à maior impacto (31 versus 44; $p<0,001$). Na análise multivariada, essas associações permaneceram significativas. Os achados evidenciam a relevância do suporte familiar e das condições clínicas da criança sobre a dinâmica familiar, contribuindo para estratégias de cuidado integral e humanizado e para ações de suporte às famílias.

Palavras-chave: Cardiopatias congênitas. Impacto biopsicossocial. Dinâmica familiar

TITLE: BIOPSYCHOSOCIAL IMPACT OF CONGENITAL HEART DISEASE ON FAMILY DYNAMICS AMONG CHILDREN RECEIVING CARE IN RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL

Abstract

Congenital heart diseases (CHD) are the most common structural anomalies at birth and are particularly relevant in the state of Rio Grande do Norte, Brazil, where consanguinity is highly prevalent and is associated with an increased risk of genetic disorder. This study aimed to investigate the biopsychosocial impact of CHD on family dynamics among children treated at a pediatric cardiac surgery referral center. This was a cross-sectional, analytical, observational study with a mixed-methods approach, using data from 2018 to 2022 and semi-structured questionnaires administered to caregivers. Psychological, social, and economic aspects related to diagnosis, treatment, and daily challenges were assessed. Among 81 caregivers, an adequate support network was associated with lower family impact, with a median total Impact on Family Scale score of 43 points versus 29 among those without adequate support ($p<0.001$). The presence of the father in the household was also associated with lower impact (42 vs. 30; $p<0.001$), whereas palliative CHD or concomitant syndromic diagnosis and/or chronic disease was associated with greater impact (31 vs. 44; $p<0.001$). In the multivariate analysis, these associations remained statistically significant. These findings highlight the relevance of family support and the child's clinical conditions to family dynamics, contributing to the development of comprehensive and humanized care strategies and support interventions for families.

Keywords: Congenital heart diseases. Biopsychosocial impact. Family dynamics.

Introdução

1. INTRODUÇÃO:

O Rio Grande do Norte é considerado o estado brasileiro com uma das maiores prevalências de consanguinidade no Brasil (REIS et al., 2023). Sabidamente, esse fenômeno predispõe uma maior chance de doenças genéticas em crianças, como as cardiopatias congênitas (CC), que constituem as anomalias mais comuns apresentadas ao nascimento (PARKER et al., 2020).

As cardiopatias congênitas compreendem um grupo heterogêneo de alterações estruturais do coração e/ou dos grandes vasos, com ampla diversidade fenotípica e diferentes graus de gravidade clínica (HOUYEL et al., 2021) . Dependendo da gravidade, podem demandar acompanhamento médico prolongado, uso contínuo de medicamentos, procedimentos invasivos e intervenções cirúrgicas (MENG et al., 2024), impondo mudanças significativas na rotina da criança e de seus familiares. Dessa forma, para além da compreensão dos aspectos etiológicos e clínicos das CC, torna-se fundamental investigar suas repercussões sobre o contexto em que a criança está inserida.

O diagnóstico de uma doença crônica impacta negativamente todos os aspectos da convivência familiar, incluindo os pais (SMITH et al., 2015) e os irmãos (O'BRIEN et al. 2009). Ter um filho com uma cardiopatia congênita afeta finanças, relações interpessoais e uma menor qualidade de vida no geral do núcleo afetado (JACKSON et

al., 2015; SOOD et al., 2018; WEI et al., 2015). Portanto, é importante compreender não apenas a etiologia dessas anomalias, mas também as implicações sociais e emocionais envolvidas, a sobrecarga dos cuidadores, os desafios no acesso à saúde e a necessidade de apoio contínuo às famílias.

Dessa forma, foi aplicado o questionário Impact on Family Scale - Short Form (IOF-SF) validado por mensurar impacto familiar da doença crônica de uma criança. A escala original com 24 itens foi desenvolvida por Stein e Riessman (STEIN et al., 1980) e é uma das mais utilizadas em estudos internacionais. A versão reduzida (short form) de 15 itens apresentou propriedades psicométricas satisfatórias, demonstrando-se uma medida válida e confiável do impacto da doença crônica infantil sobre as famílias (WILLIAMS et al., 2006).

No Brasil, Cintra realizou a tradução, adaptação cultural e validação da Impact on Family Scale para o português brasileiro, originando a Escala de Impacto Familiar Brasileira (EIF-BR). A disponibilização de um instrumento traduzido, culturalmente adaptado e validado para o português brasileiro possibilita a avaliação sistemática do impacto familiar de diferentes condições crônicas e anomalias congênitas no contexto nacional (CINTRA, 2018).

Sendo assim, no presente estudo foi aplicada para os cuidadores principais de crianças portadoras de CC a versão brasileira da escala composta por 15 itens (EIF-BR15) (Anexo A), provenientes do estudo guarda-chuva “Diagnóstico Situacional das Cardiopatias Congênitas Cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte", desenvolvido com dados do hospital de referência em cirurgias cardíacas pediátricas.

Metodologia

2. METODOLOGIA:

Trata-se de um estudo observacional, analítico, de corte transversal, com abordagem mista (quantitativa e qualitativa), realizado no estado do Rio Grande do Norte, no período de setembro de 2025 a junho de 2026. Foram inicialmente considerados 262 pacientes provenientes do banco de dados do estudo guarda-chuva “Diagnóstico Situacional das Cardiopatias Congênitas Cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte”, que continha os contatos dos responsáveis por crianças submetidas à cirurgia por cardiopatia congênita no Hospital Rio Grande, no período de 2018 a 2022.

Dos 262 contatos existentes, 98 encontravam-se desatualizados e não pertenciam mais aos participantes do estudo. Dos 164 contatos restantes, 48 responsáveis não responderam ou não atenderam às ligações realizadas, totalizando 116 responsáveis efetivamente contatados. Destes, 19 recusaram formalmente a participação no estudo.

Foram considerados como critérios de inclusão: famílias presentes no banco de dados previamente obtido, com contato telefônico atualizado, que consentiram com a participação na pesquisa e cujo paciente com cardiopatia congênita estivesse vivo no

momento da coleta. Foram excluídos 16 responsáveis que informaram o falecimento prévio da criança diagnosticada com cardiopatia congênita. Dessa forma, 81 famílias contribuíram no fornecimento de dados.

Aos 81 entrevistados, foi oferecida a possibilidade de escolha da modalidade da entrevista entre mensagem de texto por aplicativo ou ligação telefônica. Dentre os participantes, 66 optaram por mensagem de texto e 15 pela ligação telefônica.

Dessa forma, após orientações quanto ao questionário, os entrevistados responderam primeiramente às variáveis sociodemográficas e clínicas, incluindo: idade e grau de escolaridade do cuidador principal; renda familiar- expressa em salários mínimos- da residência em que o paciente com cardiopatia congênita habita; existência de diagnóstico de cardiopatia paliativa; presença concomitante de síndrome e/ou doença crônica no paciente com CC (por exemplo, síndrome de Down ou Transtorno do Espectro Autista); percepção do responsável quanto à suficiência da rede de apoio disponível para auxiliar nos cuidados da criança; número de irmãos da criança com CC; e presença do pai biológico na vida do paciente com CC.

Em seguida, o impacto das cardiopatias congênitas sobre a dinâmica familiar foi avaliado por meio da Impact on Family Scale (IOF), em sua versão brasileira de 15 itens: Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15). A escala contém 15 afirmações que contemplam aspectos da vida familiar, utilizando a pontuação baseada em alternativas do tipo Likert. Para cada afirmativa, escolhe-se uma única opção: “concordo muito” (1 ponto), “concordo” (2 pontos), “discordo” (3 pontos) e “discordo muito” (4 pontos). As frases de número 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 abordam o impacto social, já as de número 4, 11, 12, 13, 14 e 15 discorrem sobre a tensão pessoal enfrentada pelas famílias.

Pontuações mais altas indicam menos impacto negativo ou melhor adaptação, enquanto pontuações mais baixas revelam maior sobrecarga e maior impacto familiar. Foram analisados os domínios Impacto Social e Tensão Pessoal, além da Pontuação Total (PT), obtida pela soma dos dois domínios.

As análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 4.3.3 (R Core Team, Viena, Áustria). A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas foram descritas por média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil (P25–P75), conforme a distribuição dos dados, além dos valores mínimo e máximo. As variáveis categóricas foram apresentadas em frequências absolutas e relativas.

Para a comparação dos escores da EIF-BR15 entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney U, enquanto o teste de Kruskal-Wallis foi empregado nas comparações entre três ou mais categorias. Os tamanhos de efeito das comparações pelo teste de Mann-Whitney foram expressos pelo coeficiente de correlação rank-biserial, e, para o teste de Kruskal-Wallis, pelo coeficiente ε^2.

As associações entre as variáveis contínuas e os escores de Impacto Social, Tensão Pessoal e Pontuação Total foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Como análise de sensibilidade, para os desfechos Tensão Pessoal e Pontuação Total, que não apresentaram violação do pressuposto de normalidade, foram realizadas comparações paramétricas por meio do teste t de Welch, com cálculo do tamanho de efeito pelo d de Cohen.

Para identificar fatores associados de forma independente à Pontuação Total da IFS, foi ajustado um modelo de regressão linear múltipla, incluindo simultaneamente idade do cuidador, renda familiar, escolaridade, rede de apoio adequada, presença do pai no domicílio, síndrome associada/cuidados paliativos e número de irmãos. A escolaridade foi incorporada ao modelo como variável ordinal, e as variáveis binárias foram codificadas como 0 e 1. A presença de multicolinearidade foi avaliada pelo fator de inflação da variância (VIF), considerando-se não haver multicolinearidade relevante quando os valores foram inferiores a 2.

Na regressão linear, coeficientes positivos foram interpretados como associados a maiores pontuações da IFS e, consequentemente, a menor impacto familiar, enquanto coeficientes negativos foram interpretados como associados a menores pontuações e maior impacto familiar.

Foi adotado nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob o parecer nº 5.685.084 e CAAE 60821622.4.0000.5292. Todos os participantes assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação na pesquisa.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Foram analisados dados de 81 cuidadores principais de crianças com cardiopatias congênitas atendidas no estado do Rio Grande do Norte. O impacto da condição sobre a dinâmica familiar foi avaliado por meio da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), considerando os domínios Impacto Social e Tensão Pessoal, além da Pontuação Total (PT). Como as pontuações mais elevadas da escala representam menor impacto negativo e melhor adaptação familiar, enquanto pontuações mais baixas indicam maior sobrecarga e maior impacto, as associações encontradas foram interpretadas segundo essa direção.

3.1 Características da amostra:

Entre os 81 cuidadores avaliados, conforme apresentado na Tabela 1, 48 (59,3%) relataram possuir uma rede de apoio adequada, enquanto 33 (40,7%) não a consideraram suficiente. O pai estava presente no domicílio em 58 casos (71,6%) e ausente em 23 (28,4%). Em relação à condição clínica da criança, 38 participantes

(46,9%) apresentavam síndrome associada ou necessidade de cuidados paliativos, enquanto 43 (53,1%) não apresentavam essas condições. Quanto à escolaridade, 13 cuidadores (16,0%) possuíam ensino fundamental, 48 (59,3%) ensino médio e 20 (24,7%) ensino superior. A maioria apresentava escolaridade completa (71,6%).

Conforme evidenciado pela Tabela 2, a idade média dos cuidadores foi de 37,63 ± 6,36 anos, com mediana de 37 anos (intervalo interquartil: 33–43), variando entre 24 e 51 anos. O número médio de irmãos da criança foi de 1,07 ± 0,85, com mediana de 1, enquanto a renda familiar média foi de 2,39 ± 2,21 salários mínimos, com mediana de 2 salários mínimos e variação de 0,5 a 15 salários mínimos.

3.2 Escores da Escala de Impacto Familiar:

A média do domínio Impacto Social foi de 24,05 ± 6,57 pontos, com mediana de 25 (P25–P75: 19–29) e valores variando entre 10 e 36. Esse domínio apresentou distribuição não normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($W = 0,965$; $p = 0,026$). Para Tensão Pessoal, a média foi de 13,54 ± 4,42 pontos, com mediana de 14 (P25–P75: 10–16) e variação de 5 a 23 pontos. A Pontuação Total apresentou média de 37,59 pontos, mediana de 38 (P25–P75: 30–45) e valores entre 16 e 58 (Tabela 3).

Esses resultados demonstram a distribuição dos escores de impacto familiar na população estudada, permitindo avaliar posteriormente sua associação com características sociodemográficas, familiares e clínicas.

3.3 Associação entre características familiares e o impacto das cardiopatias congênitas:

Como observado a seguir na Tabela 4, a presença de uma rede de apoio adequada apresentou associação estatisticamente significativa com os três domínios avaliados. Entre os cuidadores que relataram não possuir rede de apoio adequada, a mediana do Impacto Social foi de 17 pontos, enquanto entre aqueles que relataram possuir uma rede adequada foi de 28 pontos ($p < 0,001$; $r = 0,641$). Para Tensão Pessoal, as medianas foram de 10 e 15 pontos, respectivamente ($p < 0,001$; $r = 0,551$). Na Pontuação Total, observaram-se medianas de 29 pontos entre aqueles sem rede adequada e 43 entre aqueles com rede adequada ($p < 0,001$; $r = 0,646$). Dessa forma, a presença de uma rede de apoio adequada esteve associada a maiores pontuações na IFS e, consequentemente, a menor impacto familiar.

A presença do pai no domicílio também apresentou associação significativa com os três desfechos. Para o Impacto Social, a mediana foi de 18 pontos entre os cuidadores sem pai presente no domicílio e de 26,5 pontos entre aqueles com pai presente ($p < 0,001$; $r = 0,484$). Na Tensão Pessoal, as medianas foram de 11 e 14 pontos, respectivamente ($p < 0,001$; $r = 0,513$), enquanto na Pontuação Total foram observadas medianas de 30 e 42 pontos ($p < 0,001$; $r = 0,529$). Esses resultados indicam associação entre a presença paterna e menores níveis de impacto familiar segundo a IFS (Tabela 5).

A escolaridade do cuidador também apresentou associação estatisticamente significativa com os três desfechos. No domínio Impacto Social, as medianas foram de 18 pontos para o ensino fundamental, 26 para o ensino médio e 26,5 para o ensino superior ($p = 0,013$; $\varepsilon^2 = 0,085$). Na Tensão Pessoal, as medianas foram de 10, 14 e 14 pontos, respectivamente ($p = 0,009$; $\varepsilon^2 = 0,096$). Para a Pontuação Total, as medianas foram de

26, 39,5 e 40,5 pontos nos níveis fundamental, médio e superior, respectivamente ($p = 0,009$; $\varepsilon^2 = 0,094$). Assim, maiores níveis de escolaridade estiveram associados a maiores pontuações da IFS e, portanto, a menor impacto familiar, evidenciado na Tabela 6.

Em relação à presença de síndrome e/ou doença crônica associada e/ou diagnóstico de cardiopatia paliativa, foi observado um padrão distinto. Os participantes cujas crianças apresentavam essas condições apresentaram medianas menores nos três desfechos. Para Impacto Social, a mediana foi de 20,5 pontos no grupo com síndrome associada ou cuidados paliativos, em comparação a 28 pontos no grupo sem essas condições ($p < 0,001$; $r = -0,647$). Para Tensão Pessoal, as medianas foram de 10,5 e 15 pontos, respectivamente ($p < 0,001$; $r = -0,603$). Na Pontuação Total, foram observadas medianas de 31 e 44 pontos, respectivamente ($p < 0,001$; $r = -0,663$). Considerando a direção da EIF-BR15, esses resultados indicam maior impacto familiar entre os cuidadores de crianças com síndrome associada e portadoras de comorbidades crônicas ou cardiopatias paliativas.

Como análise de sensibilidade, foram aplicados testes paramétricos para verificar a consistência dos resultados obtidos nas análises não paramétricas. Considerando que os escores de Tensão Pessoal e Pontuação Total (PT) apresentaram distribuição compatível com a normalidade, foram realizadas comparações entre os grupos por meio do teste t de Welch, acompanhadas do cálculo do tamanho de efeito pelo d de Cohen. Os resultados demonstraram associações estatisticamente significativas para rede de apoio adequada, presença paterna no domicílio e presença de síndrome, condição crônica ou necessidade de cuidados paliativos, em ambos os desfechos avaliados, com tamanhos de efeito elevados, conforme apresentado na Tabela 8.

3.4 Análise multivariada:

Na regressão linear múltipla, foram incluídas simultaneamente idade do cuidador, renda familiar, escolaridade, rede de apoio adequada, presença do pai no domicílio, síndrome associada/cuidados paliativos e número de irmãos. O modelo apresentou $R^2 = 0,723$ e R^2 ajustado = 0,696, com significância global ($F(7,73) = 27,16$; $p < 0,001$).

Após o ajuste pelas demais variáveis, a idade do cuidador apresentou associação positiva com a Pontuação Total da IFS ($\beta = 0,247$; IC95%: 0,03–0,465; $p = 0,027$), indicando que maiores idades estiveram associadas a maiores pontuações e, consequentemente, menor impacto familiar (Tabela 9).

A escolaridade também permaneceu associada à Pontuação Total ($\beta = 3,632$; IC95%: 1,035–6,228; $p = 0,007$). A presença de rede de apoio adequada apresentou associação positiva e expressiva ($\beta = 7,936$; IC95%: 4,984–10,889; $p < 0,001$), assim como a presença do pai no domicílio ($\beta = 4,951$; IC95%: 1,792–8,11; $p = 0,003$). Esses resultados reforçam a associação dessas características com maiores pontuações da EIF-BR15 e, portanto, menor impacto familiar (Tabela 9).

Por outro lado, a presença de síndrome associada e/ou doença crônica associada e/ou diagnóstico de cardiopatia paliativa apresentou coeficiente negativo ($\beta = -10,367$; IC95%: -13,032 a -7,702; $p < 0,001$), indicando associação independente com menores pontuações da EIF-BR15 e, consequentemente, maior impacto familiar. Esse foi o

maior efeito observado no modelo multivariado. Renda familiar (p = 0,873) e número de irmãos (p = 0,954) não apresentaram associação estatisticamente significativa com a Pontuação Total após o ajuste (Tabela 9).

3.5 Correlações entre variáveis contínuas e os escores da EIF-BR15:

A idade do cuidador apresentou correlação positiva e estatisticamente significativa com Impacto Social (ρ = 0,449; p < 0,001), Tensão Pessoal (ρ = 0,312; p = 0,005) e Pontuação Total (ρ = 0,415; p < 0,001). Assim, cuidadores mais velhos apresentaram maiores pontuações nos três componentes da escala (Tabela 10).

A renda familiar também apresentou correlações positivas e estatisticamente significativas com Impacto Social (ρ = 0,342; p = 0,002), Tensão Pessoal (ρ = 0,249; p = 0,025) e Pontuação Total (ρ = 0,317; p = 0,004). Portanto, na análise bivariada, maior renda familiar esteve associada a maiores pontuações da IFS e menor impacto familiar. Entretanto, essa variável perdeu significância no modelo multivariado, indicando que sua associação com a Pontuação Total não se manteve após o ajuste pelas demais características avaliadas, apresentado na Tabela 10.

O número de irmãos não apresentou correlação estatisticamente significativa com Impacto Social (ρ = -0,065; p = 0,562), Tensão Pessoal (ρ = -0,036; p = 0,749) ou Pontuação Total (ρ = -0,046; p = 0,681). Esse resultado foi consistente com a análise multivariada, na qual essa variável também não apresentou associação significativa com a Pontuação Total (Tabela 10).

3.6 Discussão dos principais achados:

Dessa forma, a amostra foi composta por “pai presente no domicílio” em 71,6% dos casos e “rede de apoio percebida como adequada” em 59,3%. Quase metade das crianças (46,9%) apresentava síndrome e/ou doença crônica e/ou doença paliativa associadas.

Os resultados demonstram que o impacto das cardiopatias congênitas sobre a dinâmica familiar esteve relacionado principalmente a variáveis de suporte familiar e às condições clínicas da criança. Entre os fatores avaliados, a presença de uma rede de apoio adequada apresentou associação consistente com menor impacto familiar, permanecendo significativa tanto nas análises bivariadas quanto no modelo multivariado. A diferença observada na Pontuação Total — mediana de 43 pontos entre aqueles com rede de apoio adequada versus 29 entre aqueles sem rede adequada; p < 0,001; r = 0,65) — evidencia a relevância desta característica para a adaptação familiar diante da cardiopatia congênita.

De maneira semelhante, a presença do pai no domicílio esteve associada a maiores pontuações da EIF-BR15 em comparação com famílias de pais ausentes (PT mediana 42 vs. 30; p < 0,001; r = 0,53). Esse achado também permaneceu significativo após o ajuste multivariado, sugerindo que, dentro da população estudada, a presença paterna se relacionou de forma independente a menor impacto familiar. A escolaridade do cuidador apresentou comportamento parecido, com maiores níveis educacionais associados a maiores pontuações da IFS tanto nas comparações entre grupos quanto na

regressão linear múltipla (PT: 26 no fundamental → 39,5 no médio → 40,5 no superior; $p = 0,009$; $\varepsilon^2 = 0,09$).

Em contraste, a presença de síndrome associada e/ou doença crônica associada e/ou diagnóstico de cardiopatia paliativa esteve fortemente relacionada a maior impacto familiar. Os participantes desse grupo apresentaram Pontuação Total mediana de 31 pontos, em comparação a 44 pontos entre aqueles sem essas condições ($p < 0,001$; $r = -0,66$; β ajustado $= -10,37$ pontos). Essa associação permaneceu significativa após o ajuste multivariado e apresentou o maior efeito no modelo, indicando que as condições clínicas avaliadas constituíram o fator mais fortemente associado ao impacto familiar entre as variáveis analisadas.

A idade do cuidador também apresentou associação consistente com os escores da EIF-BR15. A correlação positiva observada nos três desfechos (ρ entre 0,31 e 0,45; $p < 0,05$) e a permanência da associação com a Pontuação Total na análise multivariada indicam que cuidadores mais velhos apresentaram menores níveis de impacto familiar segundo a escala. Os dados disponíveis permitem identificar essa associação, mas não permitem estabelecer os mecanismos responsáveis por ela.

Embora a renda familiar tenha apresentado associação significativa com os três desfechos nas análises bivariadas ($\rho = 0,32$; $p = 0,004$; renda maior → menor impacto), essa relação não permaneceu significativa no modelo multivariado. Dessa forma, os resultados sugerem que a associação inicialmente observada entre renda e menor impacto familiar pode estar relacionada a outras covariáveis incluídas no modelo (particularmente a escolaridade, com a qual a renda tende a covariar) mas os dados deste estudo não permitem estabelecer causalidade ou determinar qual mecanismo explicaria essa relação.

Por fim, o número de irmãos não apresentou associação significativa com nenhum dos escores avaliados, tanto nas correlações de Spearman quanto na análise multivariada. Portanto, dentro da amostra estudada, essa variável não demonstrou relação estatisticamente significativa com o impacto familiar mensurado pela EIF-BR15.

Em conjunto, os achados indicam que, na população avaliada, rede de apoio adequada, presença paterna no domicílio, maior escolaridade e maior idade do cuidador estiveram associados a menores níveis de impacto familiar, enquanto a presença de síndrome associada e/ou doença crônica associada e/ou diagnóstico de cardiopatia paliativa esteve associada a maior impacto familiar. Entre essas variáveis, essa presença de agravantes clínicos nos pacientes apresentou a maior magnitude de associação no modelo multivariado.

Os resultados são coerentes com o propósito do estudo de avaliar o impacto biopsicossocial das cardiopatias congênitas sobre a dinâmica familiar, considerando não apenas as características clínicas da criança, mas também aspectos relacionados ao suporte e às condições do cuidador. O próprio trabalho estabelece que as cardiopatias congênitas podem demandar acompanhamento prolongado, medicamentos, procedimentos e intervenções cirúrgicas, com repercussões sobre a rotina da criança e de seus familiares.

Assim, os dados obtidos reforçam a importância de considerar a família como parte do cuidado à criança com cardiopatia congênita. No entanto, por se tratar de um estudo observacional e transversal, os resultados demonstram associações entre as variáveis avaliadas, não permitindo estabelecer relações causais.

Conclusão

4. CONCLUSÕES:

Os resultados deste estudo demonstraram que as cardiopatias congênitas estão associadas a diferentes níveis de impacto na dinâmica familiar, sendo esse impacto influenciado tanto por características relacionadas ao contexto social em que as crianças estão inseridas quanto pelas suas condições clínicas. Na população avaliada, a presença de uma rede de apoio adequada, a presença do pai no domicílio, maior escolaridade e maior idade do cuidador estiveram associadas a maiores pontuações na Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), indicando menor impacto familiar.

Em contrapartida, a presença de síndrome associada e/ou doença crônica associada e/ou diagnóstico de cardiopatia paliativa esteve associada a menores pontuações na EIF-BR15 e, consequentemente, a maior impacto sobre a dinâmica familiar. Essa variável apresentou a maior magnitude de associação no modelo de regressão linear múltipla, mantendo-se estatisticamente significativa após o ajuste pelas demais características avaliadas.

A renda familiar apresentou associação com menores níveis de impacto nas análises bivariadas, porém essa relação não permaneceu significativa após o ajuste multivariado. Da mesma forma, o número de irmãos não apresentou associação significativa com os escores da EIF-BR15.

Dessa forma, os achados reforçam a importância de uma abordagem integral e centrada na família no acompanhamento de menores com cardiopatias congênitas, considerando não apenas as demandas clínicas dos pacientes, mas também a disponibilidade de suporte familiar e as condições que podem influenciar a adaptação dos cuidadores. A identificação de famílias submetidas a maior impacto pode contribuir para o direcionamento de estratégias de cuidado e suporte no contexto da assistência às crianças com cardiopatias congênitas.

Por fim, considerando o delineamento observacional e transversal do estudo, os resultados devem ser interpretados como associações, não sendo possível estabelecer relações de causalidade. Ainda assim, os achados contribuem para a compreensão dos fatores relacionados ao impacto biopsicossocial das cardiopatias congênitas sobre a dinâmica familiar na população estudada.

Referências

5. REFERÊNCIAS:

ALBUQUERQUE, Sara; FONSECA, Ana; PEREIRA, Marco; NAZARÉ, Bárbara; CANAVARRO, Maria Cristina. Estudos psicométricos da versão portuguesa da Escala de Impacto Familiar (EIF). Laboratório de Psicologia, v. 9, n. 2, p. 173–187, 2011. DOI: https://doi.org/10.14417/lp.632.

ALVES, Sandra Portela; BRAZ, Ana Carolina; GRAÇA, Luís; FONTAINE, Anne Marie. Parental perceptions of the impact of a child's complex chronic condition: a validation study of the Impact on Family Scale. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 21, n. 5, p. 642, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/ijerph21050642.

AMORIM, Suerda Emiliana Cavalcanti Dantas de. Diagnóstico situacional das cardiopatias congênitas cirúrgicas no Estado do Rio Grande do Norte. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde da Mulher) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Mulher, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ações de Educomunicação em Doenças Raras. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sgtes/educomunicacao-em-doenca-raras. Acesso em: 26 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html. Acesso em: 26 fev. 2023.

BVSMS. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/. Acesso em: 28 fev. 2024.

CAMPION, M. et al. Genomic education for the next generation of health-care providers. Genetics in Medicine, v. 21, n. 11, p. 2422–2430, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41436-019-0548-4.

CINTRA, Flávia Maria Ravagnani Neves. Tradução, adaptação cultural e validação da Impact on Family Scale para o português brasileiro. 2018. Tese (Doutorado em Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, Bauru, 2018. doi:10.11606/T.61.2018.tde-06102020-124858. Acesso em: 2026-07-11.

DATASUS. Ministério da Saúde. DATASUS. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/. Acesso em: 20 jun. 2024.

GÓES, Andréa Carla de Souza; OLIVEIRA, Bruno Vinicius Ximenes de. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. Ciência & Educação (Bauru), v. 20, n. 3, p. 561–577, 2014. DOI: https://doi.org/10.1590/1516-73132014000300004.

GUYARD, Audrey; MICHELSEN, Susan I.; ARNAUD, Catherine; LYONS, Alan; CANS, Christine; FAUCONNIER, Jérôme. Measuring the concept of impact of childhood disability on parents: validation of a multidimensional measurement in a cerebral palsy population. Research in Developmental Disabilities, v. 33, n. 5, p. 1594–1604, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ridd.2012.03.029.

HOUYEL, Lucile; MEILHAC, Sigolène M. Heart development and congenital structural heart defects. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 22, p. 257–284, 2021. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-015012.

JACKSON, Alun C.; FRYDENBERG, Erica; LIANG, Rachel P.-T.; HIGGINS, Rosemary O.; MURPHY, Barbara M. Familial impact and coping with child heart disease: a systematic review. Pediatric Cardiology, v. 36, n. 4, p. 695–712, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/s00246-015-1121-9.

MELO, Josieverton Bruno Vital de. RAROS – reportagem em profundidade sobre doenças raras no Rio Grande do Norte. 2021. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Comunicação Social) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

MELO, Josieverton Bruno Vital de. Relatório técnico: raros – reportagem em profundidade sobre doenças raras no Rio Grande do Norte. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2021.

MENG, Xiao; SONG, Ming; ZHANG, Kai; LU, Weida; LI, Yunyi; ZHANG, Cheng; ZHANG, Yun. Congenital heart disease: types, pathophysiology, diagnosis, and treatment options. MedComm, v. 5, n. 7, p. e631, 2024. DOI: https://doi.org/10.1002/mco2.631.

O'BRIEN, Irene; DUFFY, Anita; NICHOLL, Honor. Impact of childhood chronic illnesses on siblings: a literature review. British Journal of Nursing, v. 18, n. 22, p. 1358–1365, 2009. DOI: https://doi.org/10.12968/bjon.2009.18.22.45562.

REIS, L. C. et al. Consanguinity and genetic diseases in Brazil: an overview. International Journal of Medical Reviews, v. 10, n. 1, p. 435–446, 2023. DOI: https://doi.org/10.30491/ijmr.2022.305198.1221.

SMITH, Joanna; SWALLOW, Veronica; COYNE, Imelda. Involving parents in managing their child's long-term condition: a concept synthesis of family-centered care and partnership-in-care. Journal of Pediatric Nursing, v. 30, n. 1, p. 143–159, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pedn.2014.10.014.

SOOD, Erica; KARPYN, Allison; DEMIANCZYK, Abigail C.; RYAN, Jennie; DELAPLANE, Emily A.; NEELY, Trent; FRAZIER, Aisha H.; KAZAK, Anne E. Mothers and fathers experience stress of congenital heart disease differently: recommendations for pediatric critical care. Pediatric Critical Care Medicine, v. 19, n. 7, p. 626–634, 2018. DOI: https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000001528.

SOUZA, C. F. M. et al. O ensino de genética na medicina: como os alunos percebem a genética clínica. Revista Brasileira de Educação Médica, v. 20, n. 2–3, p. 33–40, 2021. DOI: https://doi.org/10.1590/1981-5271V20.2-3-006.

STEIN, Ruth E. K.; JESSOP, Dorothy Jones. The impact on family scale revisited: further psychometric data. Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics, v. 24, n. 1, p. 9–16, 2003. DOI: https://doi.org/10.1097/00004703-200302000-00004.

WEI, Holly; ROSCIGNO, Cecelia I.; HANSON, Cherissa C.; SWANSON, Kristen M. Families of children with congenital heart disease: a literature review. Heart & Lung: The Journal of Critical Care, v. 44, n. 6, p. 494–511, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2015.08.005.

WILLIAMS, Arthur R.; PIAMJARIYAKUL, Ubolrat; WILLIAMS, Phoebe D.; BRUGGEMAN, Sandra K.; CABANELA, Rosa L. Validity of the revised Impact on Family (IOF) scale. The Journal of Pediatrics, v. 149, n. 2, p. 257–261, 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.04.003.

Anexos



Tabela 1 - Características sociodemográficas e clínicas de cuidadores principais de crianças com cardiopatia operadas no Rio Grande do Norte, 2026. Fonte: Dados do estudo.



Tabela 2- Características descritivas das variáveis sociodemográficas dos cuidadores principais de crianças com cardiopatia congênita, 2026Fonte: Dados do estudo.



Tabela 3- Distribuição dos escores da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15) entre os cuidadores de crianças com cardiopatia congênita, 2026 Fonte: Dados do estudo.



Tabela 4- Associação entre a adequação da rede de apoio e os escores da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), 2026 Fonte: Dados do estudo. (1):

Estatisticamente significante (p < 0,05). Interpretação dos tamanhos de efeito: r (rank-biserial) — p



Tabela 5- Associação entre a presença do pai no domicílio e os escores da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), 2026



Tabela 6- Associação entre o nível de escolaridade do cuidador e os escores da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), segundo o teste de Kruskal-Wallis, 2026



Tabela 7- Associação entre a presença de síndrome associada e/ou doença crônica e/ou doença paliativa e os escores da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), 2026



Tabela 8- Análise de sensibilidade paramétrica dos escores de Tensão Pessoal e Pontuação Total da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), 2026



Tabela 9- Fatores associados à Pontuação Total da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15): análise de regressão linear múltipla, 2026.



Tabela 10- Correlação entre variáveis sociodemográficas contínuas e os escores da Escala de Impacto Familiar Reduzida (EIF-BR15), segundo o coeficiente de Spearman, 2026



CÓDIGO: SB0707

AUTOR: LUKAS MIKAEL COUTO ARAÚJO

ORIENTADOR: GISLENE MARIA DA SILVA GANADE

TÍTULO: Efeitos da facilitação, da diversidade vegetal e de sua interação sobre o desempenho de plantas em comunidades restauradas de Caatinga

Resumo

A restauração de ecossistemas degradados exige a compreensão dos processos ecológicos que favorecem o crescimento e estabelecimento vegetal, para mitigação das consequências da degradação. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da diversidade vegetal, da facilitação e de sua interação sobre o desempenho estrutural de plantas em comunidades restauradas de Caatinga. O estudo foi conduzido no experimento BrazilDry (FLONA de Açu/RN), analisando dados de monitoramento em parcelas com diferentes níveis de facilitação, riqueza de espécies (1, 2, 4, 8 e 16) e composições. O desempenho vegetal foi mensurado por meio da altura média e do diâmetro médio da copa por parcela, utilizando Modelos Lineares Mistos (LMMs). A diversidade vegetal apresentou efeito positivo sobre a altura e o diâmetro da copa, padrão coerente com mecanismos de complementaridade no uso de recursos. A facilitação entre plantas também exerceu efeito positivo sobre o crescimento vegetativo, destacando a importância da mitigação do estresse microclimático em ambientes semiáridos. A interação entre diversidade e facilitação não apresentou efeito aditivo significativo sobre os parâmetros avaliados. Conclui-se que tanto a seleção da riqueza de espécies quanto o incentivo a interações positivas são estratégias fundamentais para alavancar a restauração florestal no semiárido.

Palavras-chave: Restauração. Facilitação. Riqueza de espécies. Semiárido.

TITLE: Effects of facilitation, plant diversity, and their interaction on plant performance in restored Caatinga communities

Abstract

Restoration of degraded ecosystems requires an understanding of ecological processes that promote plant growth and establishment to mitigate the consequences of degradation. This study aimed to evaluate the effects of plant diversity, facilitation, and their interaction on the structural performance of plants in restored Caatinga communities. The study was conducted at the BrazilDry experiment (Açu National Forest, RN, Brazil), analyzing monitoring data from plots representing different levels of facilitation, species richness (1, 2, 4, 8, and 16 species), and compositions. Plant performance was assessed

using mean height and canopy diameter per plot, modeled via Linear Mixed-Effects Models (LMMs). Plant diversity showed a positive effect on height and canopy diameter, aligned with resource complementarity mechanisms. Plant-plant facilitation also positively influenced vegetative growth, highlighting the importance of microclimate stress mitigation in dryland environments. The interaction between diversity and facilitation showed no significant additive effect on the measured structural traits. In conclusion, both species richness selection and the promotion of positive interactions represent essential strategies to enhance forest restoration in drylands.

Keywords: Restoration. Facilitation. Species richness. Drylands.

Introdução

A degradação dos ecossistemas compromete a biodiversidade, a estrutura das comunidades e seu funcionamento, tornando a restauração ecológica importante para recuperar ambientes degradados (Suding, 2011; Bullock et al., 2011). Esse desafio é particularmente relevante na Caatinga, um ecossistema sazonalmente seco marcado por pressões antrópicas, baixa disponibilidade hídrica e alta sazonalidade (Antongiovanni et al., 2018; Antongiovanni et al., 2022). Nesse contexto, compreender os processos ecológicos que favorecem o desenvolvimento das plantas é fundamental para aumentar a efetividade da restauração.

Entre os processos ecológicos que influenciam o desenvolvimento das plantas, as interações planta-planta desempenham papel importante na estruturação das comunidades, podendo apresentar efeitos negativos, associados à competição, ou positivos, associados à facilitação (Bruno et al., 2003; Fagundes et al., 2018). A facilitação ocorre quando a presença de uma planta favorece o desempenho de outra e é particularmente relevante sob condições abióticas estressantes, nas quais os benefícios das plantas vizinhas podem superar os custos da competição (Brooker et al., 2008; Soliveres & Maestre, 2014). Na Caatinga, a presença de espécies vizinhas pode favorecer o estabelecimento e o desenvolvimento das plantas por meio de modificações no microclima e na disponibilidade de recursos (Fagundes et al., 2018). Essas modificações podem ocorrer pelo sombreamento, reduzindo a exposição à alta irradiação e temperaturas elevadas e melhorando o estado hídrico das plantas vizinhas (Wright et al., 2015; 2017).

Além das interações entre plantas, a diversidade vegetal pode influenciar o funcionamento das comunidades. Comunidades com maior número de espécies podem apresentar maior produtividade devido à complementaridade no uso dos recursos, decorrente de diferenças nas estratégias funcionais das espécies (Hooper et al., 2005; Tilman et al., 2014). Na Caatinga, as espécies vegetais apresentam diferentes estratégias relacionadas à aquisição e conservação de recursos, o que pode favorecer sua coexistência em um ambiente sazonal (Fagundes et al., 2022; Wright et al., 2021). Ao explorar recursos de maneira complementar, espécies com diferentes estratégias podem reduzir a sobreposição no uso desses recursos e ampliar seu aproveitamento pela comunidade, influenciando a produtividade e o crescimento vegetal (Hooper et al., 2005; Wright et al., 2021).

Embora a diversidade vegetal e a facilitação sejam processos distintos, seus efeitos sobre

o funcionamento das comunidades podem estar relacionados. Interações facilitadoras podem contribuir para os efeitos positivos da diversidade, enquanto a própria diversidade pode modificar a intensidade dessas interações (Cardinale et al., 2002; Navarro-Cano et al., 2021). Evidências experimentais mostram que a facilitação pode depender da diversidade da comunidade, com efeitos positivos sobre a sobrevivência e biomassa em comunidades diversas sob seca (Danet et al., 2024). Em comunidades restauradas de floresta tropical semiárida, a facilitação também aumentou a produção de biomassa, embora esse efeito não tenha aumentado com a diversidade (Fagundes et al., 2023). Assim, avaliar como esses fatores se associam à altura e ao diâmetro da copa permite investigar uma dimensão específica dessa relação em comunidades restauradas de Caatinga.

Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da diversidade vegetal, da facilitação e da interação entre esses fatores sobre o desempenho de plantas em uma comunidade restaurada de Caatinga, utilizando a altura média e o diâmetro médio da copa por parcela como indicadores de desempenho. Hipotetizamos que (H1) comunidades com maior potencial de facilitação apresentem maior desempenho; (H2) comunidades com maior diversidade vegetal apresentem maior desempenho; e (H3) o efeito da facilitação sobre o desempenho irá variar em função da diversidade vegetal.

Metodologia

2.1 Área de estudo e delineamento experimental

O estudo foi realizado no experimento de restauração da Caatinga denominado BrazilDry, implementado em 2016 na Floresta Nacional de Açu, no município de Assú, Rio Grande do Norte, Brasil (5°32′20″ S; 36°57′49″ W). O experimento ocupa aproximadamente 3,5 ha e é constituído por 155 parcelas experimentais de 8 × 13 m, cada uma contendo 32 indivíduos de espécies arbóreas nativas da Caatinga. As parcelas foram estabelecidas em cinco níveis de diversidade vegetal: monoculturas e comunidades compostas por 2, 4, 8 e 16 espécies, além de parcelas-controle sem plantio.

As parcelas apresentam diferentes composições de espécies dentro de cada nível de diversidade. A distribuição das espécies entre as parcelas foi realizada por meio de um delineamento de partição aleatória, proposto por Bell et al. (2009), garantindo a ocorrência das espécies nos diferentes níveis de diversidade e uma densidade equivalente de indivíduos entre as espécies. Ao todo, o experimento apresenta 45 composições de espécies distribuídas entre os diferentes níveis de diversidade.

Além da variação na riqueza de espécies, o delineamento experimental incorpora um gradiente de interação que se estende da competição à facilitação, estabelecido a partir das características de interação das espécies presentes nas diferentes composições. Para caracterizar esse gradiente, Fagundes et al. (2018) estimaram a intensidade das interações entre espécies arbóreas da Caatinga por meio do Índice Relativo de Interação (RII), proposto por Armas et al. (2004). O índice permite representar um contínuo de interações, com valores negativos associados à competição e valores positivos à facilitação. Esses valores foram utilizados para caracterizar o potencial de interação das espécies presentes nas diferentes comunidades do experimento.

Neste estudo foram utilizados exclusivamente os dados do monitoramento realizado em 2025. As oito parcelas-controle foram excluídas das análises, totalizando 147 parcelas experimentais submetidas aos diferentes níveis de diversidade e composição de espécies.

2.2 Variáveis de desempenho, diversidade e facilitação

O desempenho das plantas foi avaliado por meio da altura e do diâmetro da copa. A altura foi medida em metros, considerando a distância vertical entre o nível do solo e o ponto mais alto da planta. O diâmetro da copa foi obtido pela maior extensão horizontal da copa, também expresso em metros. Ambas as medidas foram obtidas durante o monitoramento de 2025.

Após as medições, os valores de altura e diâmetro da copa foram agrupados de acordo com a parcela e o nível de diversidade, sendo calculada a média dos indivíduos de cada parcela. Dessa forma, foram obtidos os valores médios de altura e diâmetro da copa, utilizados como variáveis resposta nas análises.

A diversidade vegetal foi representada pelo número de espécies presentes em cada parcela, correspondente aos diferentes níveis de diversidade estabelecidos no experimento: 1, 2, 4, 8 e 16 espécies. A facilitação foi representada pelos valores de interação associados às espécies presentes em cada composição experimental, conforme o gradiente de competição–facilitação descrito anteriormente por Fagundes et al. (2018) . Dessa forma, valores negativos representam maior intensidade de competição, enquanto valores positivos representam maior intensidade de facilitação. A diversidade vegetal e a facilitação foram utilizadas como variáveis preditoras nas análises, enquanto a altura média e o diâmetro médio da copa foram utilizados como variáveis resposta.

2.3 Análise estatística

Para avaliar os efeitos da diversidade vegetal, da facilitação e da interação entre esses fatores sobre o desempenho das plantas, foram ajustados Modelos Lineares Mistos (LMMs).

Foram ajustados modelos separados para altura média e diâmetro médio da copa. A diversidade vegetal foi utilizada como variável explicativa e transformada em escala logarítmica de base 2, enquanto a facilitação foi utilizada como variável explicativa. Os modelos incluíram os efeitos da diversidade vegetal, da facilitação e da interação entre ambos, permitindo testar se o efeito da facilitação sobre o desempenho das plantas varia de acordo com o nível de diversidade vegetal.

Para a análise da altura, a variável resposta foi transformada em logaritmo natural, enquanto o diâmetro da copa foi analisado sem transformação. A composição de espécies foi incluída como efeito aleatório para considerar a estrutura de agrupamento decorrente da existência de diferentes composições de espécies dentro dos níveis de diversidade. Como diferentes parcelas podem compartilhar a mesma composição de espécies, essas parcelas podem apresentar características comuns associadas à identidade da comunidade. A inclusão da composição como efeito aleatório permite considerar essa variação entre as diferentes composições, sem que a identidade de cada composição seja tratada como um efeito fixo de interesse.

As análises foram realizadas no software R, utilizando os pacotes lme4, lmerTest e ggeffect.

Resultados e Discussões

A diversidade vegetal apresentou efeito positivo e significativo sobre a altura das plantas e sobre o diâmetro da copa, indicando que comunidades com maior riqueza de espécies apresentaram maior desempenho estrutural (Tabela 1; Figura 2; Figura 3). Esse padrão é consistente com evidências experimentais de que comunidades vegetais mais diversas podem apresentar maior produtividade e desempenho devido a efeitos de complementaridade entre as espécies (Depauw et al., 2024; Zheng et al., 2024;). A complementaridade pode ocorrer, por exemplo, por diferenças no uso dos recursos entre

as espécies, permitindo maior aproveitamento dos recursos disponíveis pela comunidade. Em florestas, maiores níveis de diversidade também podem favorecer a complexidade estrutural da vegetação, contribuindo para o aumento da produtividade (Deng et al., 2025).

A facilitação também apresentou efeito positivo e significativo sobre a altura e o diâmetro da copa, indicando que comunidades submetidas a maiores níveis de facilitação apresentaram maior desempenho estrutural (Tabela 1; figura 4; figura 5). Esse resultado reforça a importância das interações positivas em ambientes semiáridos, onde condições ambientais limitantes podem restringir o crescimento das plantas. A facilitação pode favorecer o desempenho das espécies vizinhas por meio da modificação das condições microambientais e da disponibilidade de recursos (Wright et al., 2017; Fagundes et al., 2018). No próprio experimento BrazilDry, Fagundes et al. (2023) observaram que o potencial de facilitação contribuiu positivamente para a produção de biomassa durante a restauração.

Por outro lado, a interação entre diversidade vegetal e potencial de facilitação não apresentou efeito significativo sobre a altura ou o diâmetro da copa (Tabela 1). Dessa forma, a hipótese de que o efeito da facilitação seria maior em comunidades de maior diversidade não foi corroborada. Uma possível explicação é que diversidade e facilitação possam favorecer o desempenho das plantas por mecanismos parcialmente distintos. Enquanto os efeitos da diversidade podem estar relacionados à complementaridade no uso dos recursos (Loreau & Hector, 2001; Depauw et al., 2024), a facilitação pode atuar principalmente por meio da modificação das condições ambientais experimentadas pelas plantas vizinhas (Fagundes et al., 2018).

Conclusão

Nossos resultados indicam que a diversidade vegetal e a facilitação favoreceram o desempenho estrutural das plantas restauradas, e 10 anos após a restauração seus efeitos ocorrem de forma independente. Esse resultado reforça a importância de considerar tanto a diversidade, riqueza das comunidades quanto às interações positivas entre espécies no planejamento de estratégias de restauração da Caatinga.

Referências

ANTONGIOVANNI, M.; VENTICINQUE, E. M.; FONSECA, C. R. Fragmentation patterns of the Caatinga drylands. Landscape Ecology, v. 33, p. 1353-1367, 2018. DOI: 10.1007/s10980-018-0672-6.

ANTONGIOVANNI, M. et al. Restoration priorities for Caatinga dry forests: landscape resilience, connectivity and biodiversity value. Journal of Applied Ecology, v. 59, n. 9, p. 2287-2298, 2022. DOI: 10.1111/1365-2664.14131.

ARMAS, C.; ORDIALES, R.; PUGNAIRE, F. I. Measuring plant interactions: a new comparative index. Ecology, v. 85, n. 10, p. 2682-2686, 2004. DOI: 10.1890/03-0650.

BELL, T.; LILLEY, A. K.; HECTOR, A.; SCHMID, B.; KING, L.; NEWMAN, J. A. A linear model method for biodiversity–ecosystem functioning experiments. The American Naturalist, v. 174, n. 6, p. 836-849, 2009. DOI: 10.1086/647931.

BROOKER, R. W. et al. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. Journal of Ecology, v. 96, n. 1, p. 18-34, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2007.01295.x.

BRUNO, J. F.; STACHOWICZ, J. J.; BERTNESS, M. D. Inclusion of facilitation into ecological theory. Trends in Ecology & Evolution, v. 18, n. 3, p. 119-125, 2003. DOI: 10.1016/S0169-5347(02)00045-9.

BULLOCK, J. M. et al. Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities. Trends in Ecology & Evolution, v. 26, n. 10, p. 541-549, 2011. DOI: 10.1016/j.tree.2011.06.011.

CARDINALE, B. J.; PALMER, M. A.; COLLINS, S. L. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. Nature, v. 415, p. 426-429, 2002.

DANET, A. et al. Species diversity promotes facilitation under stressful conditions. Oikos, 2024. DOI: 10.1111/oik.10303.

DENG, X. et al. Forest biodiversity increases productivity via complementarity from greater canopy structural complexity. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 122, e2506750122, 2025. DOI: 10.1073/pnas.2506750122.

DEPAUW, L. et al. Enhancing tree performance through species mixing: Review of a quarter-century of TreeDivNet experiments reveals research gaps and practical insights. Current Forestry Reports, v. 10, p. 1-20, 2024. DOI: 10.1007/s40725-023-00208-y.

FAGUNDES, M.; WEISSER, W.; GANADE, G. The role of nurse successional stages on species-specific facilitation in drylands: nurse traits and facilitation skills. Ecology and Evolution, v. 8, p. 5173-5184, 2018. DOI: 10.1002/ece3.3962.

FAGUNDES, M. V. et al. Functional traits above and below ground allow species with distinct ecological strategies to coexist in the largest seasonally dry tropical forest in the Americas. Frontiers in Forests and Global Change, v. 5, 930099, 2022. DOI: 10.3389/ffgc.2022.930099.

FAGUNDES, M. V.; MAZZOCHINI, G. G.; GANADE, G. The role of plant diversity and facilitation during tropical dry forest restoration. Journal of Ecology, v. 111, n. 6, p. 1231-1241, 2023. DOI: 10.1111/1365-2745.14091.

HOOPER, D. U. et al. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. Ecological Monographs, v. 75, n. 1, p. 3-35, 2005. DOI: 10.1890/04-0922.

LOREAU, M.; HECTOR, A. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. Nature, v. 412, p. 72-76, 2001. DOI: 10.1038/35083573.

NAVARRO-CANO, J. A.; HORNER, B.; GOBERNA, M.; VERDÚ, M. Facilitation enhances ecosystem function with non-random species gains. Oikos, v. 130, n. 12, p. 2093-2099, 2021. DOI: 10.1111/oik.08605.

SOLIVERES, S.; MAESTRE, F. T. Plant-plant interactions, environmental gradients and plant diversity: a global synthesis of community-level studies. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, v. 16, n. 4, p. 154-163, 2014. DOI: 10.1016/j.ppees.2014.04.001.

SUDING, K. N. Toward an era of restoration in ecology: successes, failures, and opportunities ahead. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 42, p. 465-487, 2011. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145115.

TILMAN, D.; ISBELL, F.; COWLES, J. M. Biodiversity and ecosystem functioning. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 45, p. 471-493, 2014. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091917.

WRIGHT, A. J. et al. Biodiversity and ecosystem functioning: have our experiments and indices been underestimating the role of facilitation? Journal of Ecology, v. 109, n. 5, p. 1962-1968, 2021. DOI: 10.1111/1365-2745.13665.

WRIGHT, A. J.; SCHNITZER, S. A.; REICH, P. B. Daily environmental conditions determine the competition–facilitation balance for plant water status. Journal of Ecology, v. 103, n. 3, p. 648-656, 2015. DOI: 10.1111/1365-2745.12397.

WRIGHT, A. J.; WARDLE, D. A.; CALLAWAY, R. M.; GAXIOLA, A. The overlooked role of facilitation in biodiversity experiments. Trends in Ecology & Evolution, v. 32, n. 5, p. 383-390, 2017. DOI: 10.1016/j.tree.2017.02.011.

ZHENG, L. et al. Effects of plant diversity on productivity strengthen over time due to trait-dependent shifts in species overyielding. Nature Communications, v. 15, p. 2078, 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-46355-z.

Anexos



Figura 1. Representação gráfica das hipóteses do estudo. (A) H1: relação esperada entre o gradiente de competição–facilitação e o desempenho das plantas, representado pela altura e pelo diâmetro da copa, com maior desempenho esperado sob maior facilitação



Figura 2: Efeito da riqueza de espécies (diversidade vegetal) no eixo (x) sobre a altura média das plantas por parcela no eixo (y).



Figura 3: Efeito da riqueza de espécies (diversidade vegetal) no eixo (x) sobre o diâmetro médio da copa por parcela no eixo (y)



Figura 4: Efeito do potencial de interação — contínuo de competição (-) a facilitação (+) no eixo (x), sobre a altura média das plantas por parcela no eixo (y).



Figura 5: Efeito do potencial de interação — contínuo de competição (-) a facilitação (+) no eixo (x), sobre o diâmetro médio da copa por parcela no eixo (y).

CÓDIGO: SB0712

AUTOR: SARAH LIMA ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: BRUNO CAVALCANTE BELLINI

TÍTULO: Descrição de nova espécie de Katianna Börner (Collembola, Katiannidae) da América do Sul: complementando estudo prévio para publicação dos dados

Resumo

O gênero Katianna Börner, 1906 compreende aproximadamente 40 espécies atualmente reconhecidas (Bellinger et al., 1996–2024), distribuídas principalmente em regiões associadas às antigas massas continentais da Gondwana. Dentre essas, cerca de 20 espécies foram descritas para a América do Sul e Central (Bellinger & Mari Mutt, 1990). Apesar dessa riqueza, não há registros nominais do gênero no Brasil, o que evidencia uma lacuna de conhecimento sobre a fauna da família no país, situação semelhante à já observada para outros grupos de Collembola (Cipola et al., 2021). Além de sua ampla distribuição, o gênero apresenta um conjunto de caracteres diagnósticos que o distingue de outrosKatiannidae. Por exemplo, Katianna pode ser separado de Sminthurinus Börner, 1901 pela presença de 2+2 ou 3+3 espinhos robustos na região frontal da cabeça, em contraste com as cerdas finas e regulares observadas em espécies de Sminthurinus. Outro traço característico é a cerda cefálica sd1, que em Katianna é alargada e espinhosa, enquanto em outros representantes da família apresenta-se mais reduzida e fina (Delamare Deboutteville & Massoud, 1963). Diferentemente de outros gêneros de Katiannidae, Katianna não possui a cerda abdominal neosminturóide, e no pequeno abdômen da fêmeas a cerda a0 é simples e não bifurcada. O objetivo deste trabalho foi descrever uma nova espécie de Katianna neotropical, complementando estudo prévio já realizado no laboratório.

Palavras-chave: Katiannidae, Fauna edáfica, Região Neotropical, Collembola.

TITLE: Description of a new species of Katianna Börner (Collembola, Katiannidae) from South America: complementing a previous study for data publication

Abstract

The genus Katianna Börner, 1906 comprises approximately 40 currently recognized species (Bellinger et al., 1996–2024), distributed mainly in regions associated with the ancient continental masses of Gondwana. Among these, about 20 species have been

described for South and Central America (Bellinger & Mari Mutt, 1990). Despite this diversity, there are no formal records of the genus in Brazil, which highlights a gap in knowledge about the Katiannidae fauna in the country, a situation similar to that already observed for other Collembola groups (Cipola et al., 2021). In addition to its wide distribution, the genus has a set of diagnostic characters that distinguish it from other Katiannidae. For example, Katianna can be separated from Sminthurinus Börner, 1901 by the presence of 2+2 or 3+3 robust spines in the frontal region of the head, in contrast to the fine bristles observed in Sminthurinus species. Another characteristic feature is the cephalic bristle sd1, which in Katianna is enlarged and spiny, while in other representatives of the family it is smaller and finer (Delamare Deboutteville & Massoud, 1963). Unlike other genera of Katiannidae, Katianna does not have a neosminturoid abdominal bristle, and in the small abdomen, the a0 bristle is simple and not bifurcated. The aim of this study was to describe a new species of neotropical Katianna.

Keywords: Katiannidae, Edaphic fauna, Neotropical region, Collembola.

Introdução

Collembola é uma das quatro classes referentes ao subfilo Hexapoda, juntamente com Protura, Diplura e Insecta (Zhang 2011, Bellinger et al. 2016). A classe é constituída por quatro ordens: Entomobryomorpha, Poduromorpha, Symphypleona e Neelipleona. Os colêmbolos são artrópodes de pequeno porte, cuja maioria das espécies apresenta dimensões corporais entre 1 e 5 mm. Estão predominantemente associados a ambientes edáficos, sendo registrados sob rochas, entre detritos vegetais ou mesmo no interior do solo, microhabitats caracterizados por condições que favorecem um modo de vida pouco evidente (Cipola et al., 2021).

Os representantes de Symphypleona e Neelipleona apresentam a maior parte dos segmentos do tronco fusionados, o que confere ao corpo uma morfologia globular. Segundo Bretfeld (1999), os Symphypleona apresentam antenas mais longas do que a cabeça; tronco constituído pela fusão dos primeiros segmentos abdominais, resultando no grande abdome, e o pequeno abdome é resultante da fusão dos segmentos finais; aparelho bucal hipognato; ausência de escamas; tórax menor que o abdome e não mais que 5 pares de tricobótrias que aparecem na região abdominal.

A família Katiannidae comporta animais de tamanho pequeno a médio, sendo os machos menores que as fêmeas. A pigmentação varia de amarelo claro a preto escuro; pode ser uniforme ou conter várias cores adicionais ou vários padrões. As cerdas são geralmente curtas e de forma normal; na cabeça e no abdômen de alguns gêneros, ocorrem espinhos ou macroquetas longas e ásperas. Existem 4 pares de tricobótrias, ABCD. As tricobótrias ABC ficam atrás do Abdomê I (Betsch & Waller, 1989); os Apêndices subanais estão direcionados para a abertura genital, na sua maioria curvados para a parte posterior, e divididos em vários ramos. Em alguns gêneros, estão presentes cerdas neosminthuroides. Apresentam 8+8 ou 6+6 olhos , sendo que C e D são frequentemente pequenos ou completamente reduzidos. Antena III pode apresentar papila; antena IV é subsegmentada. As pernas II e III geralmente têm um órgão trocantérico com uma cerda curta situada em uma cavidade oval ampliada, presença de tenent hair.

Já os membros do gênero Katianna têm 2+2 ou 3+3 espinhos alargados nos lóbulos pós-oculares e o vértice da cabeça com cerdas espinhosas (Delamare & Massoud 1963); Neste trabalho buscamos complementar o estudo prévio para publicação dos dados da nova espécie de Katianna da Região Neotropical, proveniente do Chile, depositada na Coleção de Collembola do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CC/UFRN).

Metodologia

Espécimes de Katianna depositados na CC/UFRN provenientes do Chile, Reserva Nacional Malalcahuello-Nalcas, borde de la Laguna Pehuenco, cidade de Curacautín, província de Malleco, na região de Araucanía, foram examinados para esse estudo. O material biológico foi mantido em tubos plásticos do tipo eppendorf contendo álcool 70%, e etiquetado com todas as informações de campo. A triagem foi realizada no Laboratório de Collembola da UFRN, com auxílio de um microscópio estereoscópio Leica S8AP0, Placas de Petri e pissetas. Após a triagem, os espécimes foram preparados para microscopia em lâminas semipermanentes com os reagentes: Líquido de Nesbit (para descoloração do espécime), Líquido de Arlé (substância tampão) e Líquido de Hoyer como meio de montagem, com as lâminas finais ficando em estufa a 50°C por aproximadamente uma semana. Posteriormente os espécimes foram observados sob microscópios ópticos Leica DM500 e DM750, e desenhados com o auxílio de câmaras claras acopladas aos microscópios, Os desenhos em grafite foram aprimorados e vetorizados no software CorelDraw v. 2022, onde pranchas descritivas foram organizadas. O habitus dos espécimes foi fotografado sob lupa Leica S8AP0, através do software LAS v. 4.12.

Para descrição taxonômica, a nova espécie foi comparada com congêneres neotropicais.

Resultados e Discussões

A seguir é apresentada a descrição detalhada da nova espécie e suas respectivas notas taxonômicas.

Katianna sp. nov. Albuquerque, Medeiros & Bellini

Material analisado. L2. Chile, Reserva Nacional Malalcahuello-Nalcas, borde de la Laguna Pehuenco, Curacautín, província de Malleco, Araucanía (38°25'43.1"S, 71°32'00.3"W), 26-28.xi.2023, R.O. Araujo et al. coll., coleta com pratos amarelos. Parátipos 1 macho e 1 fêmea, mesmos dados do holótipo.

Descrição. Comprimento do corpo (cabeça + tronco) da série tipo com 0.5mm,

holótipo com 0.5mm, tamanho médio dos machos = 0.15mm, tamanho médio das fêmeas =

0.5mm, tamanho médio de toda série-tipo = 0.3 mm. Espécimes com cor de fundo amarelado, com traços de pigmento alaranjado na cabeça ventral e lateral e abdômen dorsal. Parte posterior da cabeça e tronco com linhas longitudinais de pigmento azul escuro, pequeno abdômen escurecido. Apêndices majoritariamente pálidos (Fig. 1) .

Antenas. Ant IV com 11 subsegmentos: subsegmento I (basal) com 25 cerdas, duas

mais curtas que as outras; subsegmento II-X com 10 cerdas cada, duas mais curtas que as

outras; subsegmento XI com 31 cerdas, apresentando região apical com 13 cerdas mais curtas

(Fig. 2A). Ant III com 24 cerdas; órgão apical com bastões em cavidades independentes; Ant II com 16 cerdas; Ant I com 7 cerdas (Fig. 2B).

Cabeça. Olhos 6+6; região frontal com 4+4 espinhos entre as linhas de cerdas B e D, fórmula das cerdas entre as linhas A-E como: 2(+1), 1(+1),

1(+1), 2, 5(+1). Região interantenal com linhas α e γ, seguindo a fórmula 2, 2(+1). Região

clipeal com linhas de cerdas a-g, com a fórmula: 7, 8-9(+1), 5, 4, 8(+1), 5, 3,

respectivamente, mais região central com assimetria de cerdas (Figs 2C, 2E). Com 6 cerdas

pré-labrais, fórmula labral com 5 p, 5 m e 4 a cerdas, a2 em papilas, intrusões labrais

presentes (Fig. 2D). Região basal do lábio com 4 cerdas basomediais e 5 cerdas basolaterais

(Fig. 2E). Palpo maxilar com cerda basal mais curta que a apical, placa sublobal com um

apêndice setiforme (Fig. 2F). Maxilas com capítulo globoso, sem alterações; mandíbulas com

4+5 dentes incisivos (Fig. 2G).

Pernas. Perna I: epicoxa, subcoxa e coxa com 0, 1, 1 cerdas, respectivamente;

trocanter com 4 cerdas, uma maior que as outras; fêmur com 14 cerdas; tibiotarso com 46

cerdas totais, verticilo distal com doze cerdas, 7 como tenent-hairs; pré-tarso com 2 cerdas,

uma anterior e outra posterior. Unguis com um dente externo proeminente, com pseudoníquia

(com cristas serrilhadas), unguículo com um dente interno e lamela interna serrilhada,

filamento apical mais curto que o unguis (Figs 3A, 3D). Perna II: epicoxa, subcoxa e coxa

com 1, 1, 2 cerdas, respectivamente; trocanter com 5 cerdas, uma delas como órgão

trocanteral em alvéolo circular; fêmur com 15 cerdas; tibiotarso com 45 cerdas totais,

verticilo distal com 12 cerdas, 7 como tenent-hairs; pré-tarso com 2 cerdas, uma anterior e

outra posterior. Unguis com um dente externo proeminente, com pseudoníquia; unguículo

com um dente interno e lamela interna serrilhada, filamento apical mais curto que o unguis

(Figs 3B, 3E). Perna III: epicoxa, subcoxa e coxa com 1, 1, 3 cerdas, respectivamente, uma

reduzida em alvéolo largo ovalado; trocanter com 6 cerdas sendo 2 reduzidas, uma delas

como órgão trocanteral em alvéolo circular; fêmur com 15 cerdas, 3 delas de tamanho reduzido; tibiotarso com 46 cerdas totais, verticilo distal com 12 cerdas, sendo 7 do tipo

tenent-hair; pré-tarso com 2 cerdas, uma anterior e outra posterior. Unguis com um dente

externo proeminente, com pseudoníquia; unguículo com um dente interno e lamela interna

serrilhada, filamento apical mais curto que o unguis (Figs 3C, 3F).

Tronco. Grande abdômen: globoso, sem segmentação aparente, com quetotaxia

densa, cerdas simples e lisas, espinhos dorsais ausentes; tricobótrias A-C presentes e

desalinhadas; Th II com linhas a, m com 1, 3 cerdas, respectivamente; Th III com linhas a, m

com 1, 7 cerdas, respectivamente; Abd I com linhas a, m, p com 8, 8, 1 cerdas,

respectivamente; Abd II com linhas a, m, p com 6, 9, 10 cerdas, respectivamente, incluindo

tricobótrias; Abd III-IV com 5 linhas longitudinais dorso-posteriores acima da tricobótria B,

dI-1, dII-1, dIII-1, dIV-1, dV-1 com 4, 5, 5, 6, 5 cerdas, respectivamente. Área parafurcal

com 11 cerdas em três linhas, sem cerda neosminturóide (Fig. 4A). Pequeno abdômen

feminino com Abd V-VI, Abd V com tricobótria D; valva anal dorsal com cerdas as1-3,

ams1-3, ms1-5, mps1-3, ps1-2, cerdas as1, ams1, ms1 e ps1 ímpares; valva anal ventral com

cerdas aai1-7, ai1-7, mi1-5, mpi1-3, pi1-3, mais uma cerda sem homologia clara (?). Placa

genital feminina com 5+5 cerdas na região ventral da abertura (Fig. 4B). Pequeno abdômen

masculino com Abd V-VI, Abd V com tricobótria D; valva anal dorsal com cerdas as2-3,

ams2-3, ms1-5, mps1-2, ps1-2, cerdas ms1 e ps1 ímpares; valva anal ventral com cerdas ai1-

3, mi1-3, mpi1-5, pi1-3. Placa genital masculina com 9+9 cerdas na região ventral da

abertura (Fig. 4C). Tenáculo com 3 cerdas. Colóforo com 1+1 cerdas.

Fúrcula. Relação manúbrio: dens: mucro do holótipo = 1: 2,1 :0,6. Manúbrio com 8 cerdas dorsais de cada lado (Fig. 4). Dens dorsalmente com 17 cerdas, ventralmente com 6 cerdas, com a fórmula 1...2, 3 da base para o ápice (Fig. 4). Mucro com lamela interna serrilhada e externa lisa, cerda mucronal ausente (Fig. 4).

Conclusão

Apesar da classe Collembola constituir um dos táxons mais abundantes e amplamente distribuídos nos ecossistemas terrestres, observa-se um déficit significativo de estudos voltados para esse grupo na região Neotropical. Essa lacuna de conhecimento reflete-se especialmente em gêneros pouco explorados de Symphypleona, como Katianna (Börner, 1906), cuja diversidade e distribuição permanecem subestimadas em grande parte da América do Sul. O presente estudo contribui para reduzir essa escassez ao apresentar a descrição detalhada de uma nova espécie do gênero. A relevância de pesquisas envolvendo colêmbolos decorre do papel fundamental que esses organismos desempenham nos ecossistemas, atuando na ciclagem de nutrientes, na estruturação do solo e na manutenção da qualidade ambiental. Nesse sentido, a ampliação dos estudos

taxonômicos e ecológicos sobre o grupo é essencial não apenas para compreender melhor a biodiversidade local, mas também para subsidiar ações de conservação. Assim, este trabalho reforça a importância de iniciativas alinhadas ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 15 (ODS 15) da Agenda 2030 da ONU, que visa gerar dados para conservar os ecossistemas terrestres e garantir o uso sustentável da biodiversidade.

Referências

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. Checklist of the Collembola of the World. 1996–2024. Disponível em: http://www.collembola.org. Acesso em: 24 ago. 2026.

BETSCH, J. M.; WALLER, A. L'armement en trichobothries des Collemboles Symphypléones: Recherches de schemas chétotaxiques. In: The Third International Seminar on Apterygota. Siena University, Siena. p. 15-31, 1989.

BÖRNER, C. Das system der Collembolen nebst Beschreibung neuer Collembolen des Hamburger Naturhistorischen Museums. Mitteilungen aus den Naturhistorischen Museum in Hamburg, 23, 147–188, 1906.

BRETFELD, Gerhard. Synopses on Palaearctic Collembola. Volume 2: Symphypleona. Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz, v. 71, p. 1–318, 1999.

CIPOLA, N. G. et al. New species of Arlesminthurus Arlé, 1959 and Calvatomina Yosii, 1966 (Collembola: Symphypleona) from northeastern Brazil. Insects, v. 12, n. 5, p. 433, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/insects12050433.

DELAMARE DEBOUTTEVILLE, Cl.; MASSOUD, Zaher. Collemboles Symphypléones. Biologie de l'Amérique australe, v. 2, p. 169–289, 1963.

MARI MUTT, J. A.; BELLINGER, P. F. Symphypleona of the Caribbean Basin. Caribbean Journal of Science, v. 26, n. 1–2, p. 1–48, 1990.

ZHANG, Zhi-Qiang (Ed.). Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Zootaxa, v. 3148, p. 1–237, 2011.

Anexos



Figura 1. Habitus dorsal de Katianna sp. nov., espécime fixado em etanol a 70%



Figura 2. Cabeça e antenas de Katianna sp. nov.: A, Ant. IV; B, Ant I- III; C, Cabeça anterior e olhos, asteriscos indicam cerdas ímpares; D, Área pré-labral e labral (vista dorsal); E, Região labial e pós-labial (visão ventral); F, Lobo maxilar externo e



Figura 3. Pernas de Katianna sp. nov.: A, Perna I; B, Perna II; C, Perna III; D, Complexo empodial I; E, Complexo empodial II; F, Complexo empodial III.



Figura 4. Tronco de Katianna sp nov. A, Grande abdômen; B, Pequeno abdômen e valva anal (fêmea), asteriscos indicam cerdas ímpares ímpares; C, Pequeno abdome e valva anal (macho), asteriscos indicam cerdas ímpares.



Figura 5. Fúrcula de Katianna sp. nov em vista dorso-lateral, região interna. Cerdas ventrais do dens marcadas com linhas pontilhadas.

CÓDIGO: SB0719

AUTOR: JAYANE MARIA DO NASCIMENTO SILVA

ORIENTADOR: ELAINE CRISTINA GAVIOLI

TÍTULO: Efeitos comportamentais de cetamina e DMT na prevenção do fenótipo desamparado em camundongos

Resumo

Transtornos mentais induzidos por estresse, como a depressão e o estresse pós-traumático, representam importantes causas de afastamento laboral. Os antidepressivos convencionais apresentam limitações significativas incluindo o tempo prolongado para o início da resposta terapêutica, elevada incidência de efeitos colaterais e eficácia limitada, sobretudo em pacientes resistentes. Diante dessa lacuna, o desenvolvimento de intervenções de ação rápida e melhor tolerabilidade torna-se essencial. Nesse cenário, a cetamina e os compostos psicodélicos surgem como alternativas promissoras. Embora a ação profilática da cetamina contra os impactos do estresse já seja relatada na literatura, o potencial protetor dos psicodélicos permanece pouco explorado. Com o objetivo de avaliar a eficácia profilática do tratamento com S-cetamina ou N,N-dimetiltriptamina (DMT), o presente estudo utilizou um modelo experimental em camundongos submetidos ao estresse inescapável por choques nas patas. A administração prévia de S-cetamina (30 mg/kg, i.p.) ou DMT (10 mg/kg, i.p.), 24 horas antes das sessões de estresse, aumentou significativamente a frequência de fuga dos animais. Enquanto 68% do grupo controle desenvolveu o fenótipo de desamparo aprendido, o tratamento com S-cetamina e DMT reduziu essa taxa para 44% e 33%, respectivamente. Além disso, os compostos não alteraram a locomoção espontânea. Conclui-se que a S-cetamina e a DMT exercem efeito protetor contra o desenvolvimento do fenótipo depressivo

Palavras-chave: S-cetamina; DMT; Psicodélicos; Efeito profilático; Desamparo aprendido

TITLE: Prophylactic effect of s-ketamine and n,n-dimethyltryptamine on helpless behavior in mice

Abstract

Stress-induced mental disorders, such as depression and post-traumatic stress disorder, represent major causes of work absence. Conventional antidepressants present significant limitations, including a delayed onset of therapeutic response, a high incidence of side effects, and limited efficacy, particularly in treatment-resistant

patients. Given this gap, the development of rapid-acting interventions with improved tolerability is essential.In this scenario, ketamine and psychedelic compounds emerge as promising alternatives. Although the prophylactic effect of ketamine against stress impacts has been reported in the literature, the protective potential of psychedelics remains largely unexplored. To evaluate the prophylactic efficacy of treatment with S-ketamine or N,N-dimethyltryptamine (DMT), this study used an experimental model in mice subjected to inescapable foot-shock stress.Pre-treatment with S-ketamine (30 mg/kg, i.p.) or DMT (10 mg/kg, i.p.), 24 hours prior to stress sessions, significantly increased the escape frequency of the animals. While 68% of the control group developed the learned helplessness phenotype, treatment with S-ketamine and DMT reduced this rate to 44% and 33%, respectively. Furthermore, the compounds did not alter spontaneous locomotion. In conclusion, S-ketamine and DMT exert a protective effect against the development of the depressive-like phenotype.

Keywords: S-ketamine; DMT;Psychedelics; Prophylactic effect;Learned helplessness

Introdução

Transtornos mentais induzidos por estresse, como ansiedade, depressão e estresse pós-traumático (PTSD), afetam mais de meio bilhão de pessoas globalmente, respondendo por cerca de 14% da carga mundial de doenças e constituindo as principais causas de absenteísmo e perda de qualidade de vida (Kalish et al., 2017; Yatham et al., 2017; WHO, 2017; Vos et al., 2020).

A vulnerabilidade a essas condições é intensificada por estressores traumáticos e crises globais, como a pandemia de COVID-19, que elevou a incidência de quadros depressivos, ansiosos e estresse pós-traumático decorrentes do isolamento social (Southwick et al., 2005; Arora et al., 2020; Cost et al., 2022; Portugal et al., 2022).

O tratamento farmacológico convencional da depressão baseia-se em fármacos que aumentam monoaminas sinápticas, como serotonina e noradrenalina (Malhi et al., 2026). Contudo, a prática clínica enfrenta limitações severas: a resposta terapêutica é lenta (levando semanas), a incidência de efeitos colaterais compromete a adesão e cerca de metade dos pacientes não atinge a remissão, configurando quadros de depressão resistente (Martinowich et al., 2013; Han & Nestler, 2017; Malhi & Mann, 2018).

Diante disso, antidepressivos de ação rápida surgem como alternativa promissora por induzir remissão com poucas doses e sustentar efeitos terapêuticos além da sua meia-vida farmacocinética (Wilkinson & Sanacora, 2018; Witkin et al., 2019). A cetamina, antagonista dos receptores NMDA glutamatérgicos, destacou-se por sua ação antidepressiva rápida em doses subanestésicas (Berman et al., 2000). Paralelamente, psicodélicos agonistas dos receptores 5-HT2A — como LSD, psilocibina, MDMA e dimetiltriptamina (DMT) — demonstraram potencial terapêutico relevante ao modular os sistemas serotonérgico, dopaminérgico e glutamatérgico (Schipper et al., 2024).

Embora a ação antidepressiva aguda desses compostos seja documentada, seu potencial profilático na prevenção do desenvolvimento de transtornos psiquiátricos sob estresse

ainda é pouco explorado. Evidências pré-clínicas pioneiras demonstraram que a S-cetamina confere proteção contra o fenótipo depressivo induzido por estresse em roedores (Brachman et al., 2016), achado corroborado por investigações subsequentes em modelos animais e estudos clínicos (Mastrodonato et al., 2020; Evers et al., 2022; Chen et al., 2024; Wang et al., 2024). Em contrapartida, a avaliação do efeito profilático de agonistas 5-HT2A permanece limitada a dados pré-clínicos incipientes (Liu et al., 2023; Wang et al., 2025).

Diante dessa lacuna, o presente estudo investigou o potencial profilático do pré-tratamento com S-cetamina e DMT na prevenção do fenótipo tipo depressivo em camundongos submetidos ao estresse por choques inescapáveis nas patas.

Metodologia

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, 60 dias, pesando 30-35 g, provenientes do Biotério do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais foram alojados em caixas de dimensões 41 x 34 x 16 cm com no máximo 8 animais por caixa. Foi permitido livre acesso à água e comida e foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1°C) e luz (ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, luzes acesas às 6:00 da manhã). Todos os procedimentos experimentais foram feitos de acordo com as recomendações da Lei nº 11.794 de 08/10/2008 (Lei Arouca). O presente projeto foi previamente aprovado para execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte sob o protocolo Nº 334.016/2023.

Drogas e tratamentos

As seguintes drogas foram utilizadas nesse estudo: S-Cetamina 30 mg/kg, intraperitoneal (ip; Cristalia, SP, Brasil) e N,N-dimetiltriptamina (DMT), 10 mg/kg, ip, (Biosynth Ltd, Inglaterra). As doses dos antidepressivos de ação rápida testadas em camundongos foram selecionadas com base em estudos anteriores (BRACHMAN et al., 2016; DE SOUSA-SILVA et al., 2026). O veículo utilizado na solubilização das drogas testadas foi utilizado como controle negativo. A cetamina e o DMT foram administrados uma única vez, 24 h antes do estresse inescapável.

Testes comportamentais

Teste do desamparo aprendido: indução do estresse inescapável em camundongos

O estresse inescapável foi conduzido conforme previamente realizado em nosso laboratório (HOLANDA et al., 2019). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico com um aço inoxidável piso de grade (0,3 × 1 cm) ligado a um gerador de choque elétrico. O aparelho é dividido em dois compartimentos (50 × 30 × 30 cm) por uma porta guilhotina (12 × 25 cm). Os camundongos foram submetidos a

choques elétricos nas patas durante três dias consecutivos. Nos dias 1 e 2, os camundongos foram expostos a 150 e 120 ciclos de choques elétricos inescapáveis, respectivamente, atribuídos aleatoriamente (0,5 mA, duração do choque de 1–10 s, intervalo médio de 10 s). No dia 3, os animais foram expostos a 30 ciclos de choques elétricos escapáveis nas patas (0,5 mA, duração do choque de 1–10 s, intervalo médio de 20 s); neste caso, eles puderam escapar dos choques elétricos movendo-se para o outro lado da caixa. Nesta sessão de choques escapáveis foram avaliados os seguintes parâmetros: latência (s) para escape (i.e., mudar de lado da caixa) e número de escapes. A avaliação do movimento entre os lados da câmara foi registrada manualmente por um observador experiente sem conhecimento das condições de tratamento. Na sessão de choques escapáveis, de acordo com o número de fugas apresentado, os animais foram categorizados como desamparados quando o número de fugas foi inferior a 10. Porém, quando o número de fugas nesta sessão foi superior a 10, os camundongos foram classificados como resilientes.

Avaliação de atividade locomotora espontânea

A fim de excluir potencial efeito capaz de enviesar a interpretação dos resultados, o efeito dos fármacos na locomoção espontânea foi avaliado no teste do campo aberto. O teste de campo aberto consistiu em colocar o animal para explorar uma arena quadrada (40 cm x 40 cm) delimitada por paredes de 40 cm de altura. Cada animal foi colocado individualmente no aparato e sua atividade motora foi monitorada por 30 minutos, em blocos de 5 minutos, através do software ANY-MAZE. Após os 30 minutos, os animais foram retirados e o campo foi limpo com álcool 5% antes da utilização do teste por outro roedor. A distância total percorrida (em mm) foi analisada.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± Erro Padrão da Média (EPM). Foram verificados à normalidade e homogeneidade de variância antes do uso de testes estatísticos paramétricos. Diferenças significativas entre os dados de latência de escape foram avaliados usando ANOVA de uma ou duas-vias (para fatores independentes: ciclos de choque e tratamentos), quando necessário, seguido pelo teste post hoc de Dunnett. A análise de contingência foi avaliada utilizando o teste do Chi-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$. A análise estatística foi realizada no Software GraphPad Prism versão 9.0 para Windows (Software Graph Pad Inc., San Diego, EUA).

Resultados e Discussões

O potencial efeito profilático da administração de S-cetamina e DMT foram avaliados no modelo do desamparo aprendido em camundongos. Vinte e quatro horas antes do início da exposição ao estresse inescapável os animais foram tratados com S-cetamina (fármaco de referência, cujo efeito protetivo contra o estresse já foi descrito na literatura) ou DMT por via intraperitoneal. No dia seguinte, os animais foram expostos a duas sessões de choques nas patas inescapáveis, ocorridas em dias consecutivos e, 24 h após a última sessão, os camundongos foram então expostos a uma sessão de choques

escapáveis. Na sessão de choques escapáveis, os seguintes parâmetros foram avaliados: frequência de fugas do lado eletrificado da câmara e latência média das fugas. Além disso, com base na frequência de fugas, o comportamento dos animais foi categorizado como desamparado ou resiliente.

A figura 1a ilustra a frequência de fugas na sessão de choques escapáveis. Observa-se que o número de fugas dos animais do grupo controle encontra-se majoritariamente abaixo do ponto de corte que é de 10 fugas (13/19 animais; Fig. 1a). Já para os grupos tratados observa-se prevalência da frequência de fugas acima de 10 (S-cetamina: 8/18; DMT: 6/18; Fig. 1a). De forma quantitativa, observa-se que a média de fugas na sessão de choques escapáveis tende a diferir entre os grupos (Fig. 1b, ANOVA 1-via, $F(2,52)=2,58$, $p=0,08$), havendo tendência a ser significativamente maior que o controle nos grupos tratados com S-cetamina e DMT. Essa diferença indica que os tratamentos com S-cetamina e DMT antes do estresse inescapável favorecem que o animal busque por escapar dos choques, quando é dada a opção de escape.

Na figura 1b, observa-se a latência média de fugas entre os grupos na sessão de choques escapáveis apresentada em blocos de 15 ciclos de choques. Para este parâmetro, detectou-se redução significativa da latência de fugas nos primeiros 15 ciclos de choques nos animais tratados com S-cetamina e DMT em comparação com o controle (Fig. 1b, ANOVA 2-via, efeito do tratamento: $F(2,104)=3,23$, $p<0,05$), sugerindo que os animais tratados com S-cetamina e DMT fogem mais rápido que os controles nos primeiros 15 ciclos de choques nas patas. O comportamento observado na figura 1b está de acordo com o aumento das fugas do lado eletrificado da caixa, observado na figura 1a. Essa observação corrobora a ideia de que o tratamento anterior ao estresse com a S-cetamina ou DMT pode facilitar o comportamento de fuga do lado eletrificado da caixa.

A figura 1c ilustra o percentual de animais tratados com S-cetamina ou DMT 72 h antes da sessão de choques inescapáveis que apresentam comportamento desamparado ou resiliente. Calculou-se que 68% dos camundongos do grupo controle foram categorizados como desamparados. Já no grupo S-cetamina e DMT, os percentuais de animais desamparados reduziram significativamente para 44% e 33%, respectivamente, conforme demonstrado pelo teste do Chi-quadrado (Fig. 1c; Chi-quadrado=25,66, df=2, $p<0,0001$), sugerindo que o percentual de animais desamparados está associado ao tratamento utilizado. Os animais desamparados apresentam diversas alterações comportamentais que se assemelham à depressão em humanos (MAIER, 1984).

Dados da literatura já demonstraram o efeito profilático da S-cetamina (30 mg/kg), quando administrada uma semana antes das sessões de estresse inescapável (BRACHMAN et al., 2016). Nas nossas condições experimentais, observamos que a S-cetamina induziu alterações semelhantes às já reportadas. Por outro lado, este é o primeiro relato de efeito profilático da DMT em camundongos. No entanto, até o momento, apenas um estudo apontou para o potencial efeito protetor contra o estresse induzido por um psicodélico, a psicilocibina (WANG et al., 2025). É interessante ressaltar que tanto a psilocibina quanto o DMT atuam ativando receptores de serotonina, 5-HTR, do tipo 2A e 1A. A ativação de receptores 5-HT2A pela psilocibina e DMT medeiam os efeitos alucinatórios desses psicodélicos, conforme já amplamente descrito na literatura (HALBERSTADT et al., 2020).

Por fim, mas não menos relevante, de forma a investigar o efeito do tratamento com S-cetamina ou DMT na locomoção espontânea de camundongos, utilizamos o teste do campo aberto. Nesta abordagem, buscamos compreender se o tratamento anterior ao estresse com S-cetamina e DMT eram capazes de alterar a locomoção dos animais, o que poderia causar viés na interpretação dos dados acima apresentados. Como observado na figura 1d, o tratamento com S-cetamina e DMT (76 h antes) no teste do campo aberto não alterou significativamente a locomoção espontânea dos animais, reforçando o efeito profilático contra o estresse observado no modelo de choques escapáveis.

Conclusão

Neste estudo concluímos que S-cetamina e DMT, quando administradas 24 h antes do estresse inescapável, facilitou a fuga dos animais, quando expostos à sessão de choques escapáveis. Além disso, o tratamento com S-cetamina e DMT reduziu significativamente o percentual de animais desamparados, ou seja, protegendo os animais de apresentarem o fenótipo depressivo. Por fim, os dados apontam que o tratamento com S-cetamina e DMT não alterou a locomoção espontânea dos animais, sugerindo que o efeito profilático do tratamento não foi enviesado pela locomoção dos animais.

Referências

ARORA, T., GREY, I., ÖSTLUNDH, L., LAM, K. B. H., OMAR, O. M., & ARNONE, D. (2020). The prevalence of psychological consequences of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of observational studies. Journal of Health Psychology, 135910532096663.

BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biological Psychiatry, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 351–354, 2000.

BRACHMAN, R. A.; MCGOWAN, J. C.; PERUSINI, J. N. et al. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. Biological Psychiatry, [s. l.], v. 79, n. 9, p. 776–786, 2016.

CHEN Y, GUO Y, WU H, TANG YJ, SOORANNA SR, ZHANG L, CHEN T, XIE XY, QIU LC, WU XD. Perioperative Adjunctive Esketamine for Postpartum Depression Among Women Undergoing Elective Cesarean Delivery: A Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open. 2024 Mar 4;7(3):e240953. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2024.0953.

COST, K.T., CROSBIE, J., ANAGNOSTOU, E. et al. Mostly worse, occasionally better: impact of COVID-19 pandemic on the mental health of Canadian children and adolescents. Eur Child Adolesc Psychiatry 31, 671–684 (2022). https://doi.org/10.1007/s00787-021-01744-3

DE SOUSA-SILVA AN, MOURA CA, DE OLIVEIRA TORRES CI, MARQUES VB, DO NASCIMENTO SILVA JM, LOBÃO-SOARES B, RUSCHI SILVA S, GALVÃO-COELHO NL, PALHANO-FONTES F, ARAÚJO DB, DA SILVA ED JR, GAVIOLI EC. N,N-dimethyltryptamine elicits antidepressant and anxiolytic effects in helpless mice: a comparative study with S-ketamine. Neuropharmacology. 2026 Jul 1;292:110947. doi: 10.1016/j.neuropharm.2026.110947.

DURANKUŞ, F; AKSU, E. Effects of the COVID-19 pandemic on anxiety and depressive symptoms in pregnant women: a preliminary study. The Journal of maternal-fetal & neonatal medicine, v. 35, n. 2, p. 205-211, 2022. https://doi.org/10.1080/14767058 .2020.1763946.

EVERS AG, MURROUGH JW, CHARNEY DS, COSTI S. Ketamine as a prophylactic resilience-enhancing agent. Front Psychiatry. 2022 Jul 28;13:833259. doi: 10.3389/fpsyt.2022.833259.

HALBERSTADT AL, GEYER MA. Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice: detection of the behavior based on the dynamics of head movement. Psychopharmacology (Berl). 2013 Jun;227(4):727-39. doi: 10.1007/s00213-013-3006-z. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23407781; PMCID: PMC3866102.

HAN, M.-H.; NESTLER, E. J. Neural Substrates of Depression and Resilience. Neurotherapeutics, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 677–686, 2017.

HOLANDA VAD, PACIFICO S, AZEVEDO NETO J, FINETTI L, LOBÃO-SOARES B, CALO G, GAVIOLI EC, RUZZA C. Modulation of the NOP receptor signaling affects resilience to acute stress. J Psychopharmacol. 2019 Dec;33(12):1540-1549. doi: 10.1177/0269881119864942. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31337258.

JOSEPH, C.A., O'SHEA, B.Q., EASTMAN, M.R. et al. Physical isolation and mental health among older US adults during the COVID-19 pandemic: longitudinal findings from the COVID-19 Coping Study. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol 57, 1273–1282 (2022). https://doi.org/10.1007/s00127-022-02248-4

LIU G, MA L, QU Y, WAN X, XU D, ZHAO M, MURAYAMA R, HASHIMOTO K. Prophylactic effects of arketamine, but not hallucinogenic psychedelic DOI nor non-hallucinogenic psychedelic analog lisuride, in lipopolysaccharide-treated mice and mice exposed to chronic restrain stress. Pharmacol Biochem Behav. 2023 Dec;233:173659. doi: 10.1016/j.pbb.2023.173659. Epub 2023 Oct 14. PMID: 37844631.

KALISCH, R.; BAKER, D. G.; BASTEN, U et al. The resilience framework as a strategy to combat stress-related disorders. Nature Human Behaviour, [s. l.], v. 1, n. 11, p. 784–790, 2017.

MAIER SF. Learned helplessness and animal models of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1984;8(3):435-46. PMID: 6385140.

MALHI GS, BELL E, STAVDAL A, WU CY, NAYLOR A, KUMARI V. Depression. Lancet. 2026 May 2;407(10540):1738-1756. doi: 10.1016/S0140-6736(26)00201-1. PMID: 42070574.

MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. The Lancet, [s. l.], v. 392, n. 10161, p. 2299–2312, 2018.

MARTINOWICH, K.; JIMENEZ, D. V.; ZARATE, C. et al. Rapid antidepressant effects: moving right along. Molecular Psychiatry, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 856–863, 2013.

MASTRODONATO A, COHENSEDGH O, LAGAMMA CT, MCGOWAN JC, HUNSBERGER HC, DENNY CA. Prophylactic (R,S)-ketamine selectively protects against inflammatory stressors. Behav Brain Res. 2020 Jan 27;378:112238. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112238. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31563463.

PORTUGAL, L. C., GAMA, C. M. F., GONÇALVES, R. M., MENDLOWICZ, M. V., ERTHAL, F. S., MOCAIBER, I., OLIVEIRA, L. D. (2022). Vulnerability and Protective Factors for PTSD and Depression Symptoms Among Healthcare Workers During COVID-19: A Machine Learning Approach. Frontiers in psychiatry, 12, 752870.

QI, G., YUAN, P., QI, M., HU, X., SHI, S., SHI, X. (2022). Influencing factors of high PTSD among medical staff during COVID-19: evidences from both meta-analysis and subgroup analysis. Safety and Health at Work. https://doi.org/10.1016/j.shaw.2022.06.003

SCHIPPER S, NIGAM K, SCHMID Y, PIECHOTTA V, LJUSLIN M, BEAUSSANT Y, SCHWARZER G, BOEHLKE C. Psychedelic-assisted therapy for treating anxiety, depression, and existential distress in people with life-threatening diseases. Cochrane Database Syst Rev. 2024 Sep 12;9(9):CD015383. doi: 10.1002/14651858.CD015383.pub2. PMID: 39260823; PMCID: PMC11390284.

SOUTHWICK, S. M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D. S. The Psychobiology of Depression and Resilience to Stress: Implications for Prevention and Treatment. Annual Review of Clinical Psychology, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 255–291, 2005.

STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. Psychopharmacology (Berl). 1985;85(3):367-70. doi: 10.1007/BF00428203. PMID: 3923523.

VOS, T. et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet, [s. l.], v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 2020.

WANG S, DENG CM, ZENG Y, CHEN XZ, LI AY, FENG SW, XU LL, CHEN L, YUAN HM, HU H, YANG T, HAN T, ZHANG HY, JIANG M, SUN XY, GUO HN, SESSLER DI, WANG DX. Efficacy of a single low dose of esketamine after childbirth

for mothers with symptoms of prenatal depression: randomised clinical trial. BMJ. 2024 Apr 10;385:e078218. doi: 10.1136/bmj-2023-078218. PMID: 38808490; PMCID: PMC11957566.

WANG Z, ROBBINS B, ZHUANG R, SANDINI T, VAN BRUGGEN R, LI XM, ZHANG Y. Early psilocybin intervention alleviates behavioral despair and cognitive impairment in stressed Wistar rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2025 Jan 10;136:111243. doi: 10.1016/j.pnpbp.2024.111243. Epub 2025 Jan 3. PMID: 39756636.

WITKIN, J. M.; MARTIN, A. E.; GOLANI, L. K. et al. Rapid-acting antidepressants. In: Advances in Pharmacology. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 47–96.

WILKINSON, S. T.; SANACORA, G. A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems. Drug Discovery Today, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 606–615, 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: 2017, 2017. p. 1–23.

YATHAM, S.; SIVATHASAN, S.; YOON, R. et al. Depression, anxiety, and post-traumatic stress disorder among youth in low and middle income countries: A review of prevalence and treatment interventions. Asian Journal of Psychiatry, [s. l.], v. 38, p. 78–91, 2018.

CÓDIGO: SB0735

AUTOR: LUIZA GIOVANA PAULINO TINOCO

COAUTOR: DANIELLE BORGES BENTO DE OLIVEIRA

COAUTOR: THIAGO GONZALES SAMARITANO VILLALPANDO SILVA

COAUTOR: JECYMARA REGO DA SILVA TINOCO PEREIRA

ORIENTADOR: VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO

TÍTULO: Estudo do percurso do Toxoplasma gondii em modelo murino durante a fase aguda por meio de detecção molecular

Resumo

As infecções congênitas por agentes com tropismo pelo sistema nervoso central podem interferir no desenvolvimento fetal e neonatal. Nesse contexto, a infecção por Toxoplasma gondii e pelo vírus Zika (ZIKV), isoladamente ou em coinfecção, apresenta relevância devido aos possíveis impactos no desenvolvimento neurológico. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da infecção congênita por *T. gondii*, ZIKV e pela coinfecção sobre o desenvolvimento neonatal em modelo murino. Foram estabelecidos quatro grupos: controle, *T. gondii*, ZIKV e coinfecção. As fêmeas destinadas à infecção por *T. gondii* foram previamente infectadas e, após a fase crônica, submetidas ao acasalamento. Durante a gestação, os grupos ZIKV e coinfecção receberam inoculação viral, enquanto o controle recebeu PBS. O desenvolvimento pós-natal foi acompanhado entre P01 e P12, com avaliação do ganho ponderal, estado geral e testes neurocomportamentais. Até o momento, foram obtidas ninhadas dos grupos controle, ZIKV e coinfecção e realizados testes de preensão palmar, endireitamento, geotropismo negativo, resposta às vibrissas e aversão ao precipício. Os resultados preliminares indicaram aquisição progressiva de respostas sensório-motoras. As análises histológicas, imuno-histoquímicas e imunológicas estão em andamento. A continuidade permitirá correlacionar os achados comportamentais às alterações teciduais e imunológicas.

Palavras-chave: Toxoplasma gondii; Vírus Zika; Infecção congênita; Modelo murino.

TITLE: Study of the Course of Toxoplasma gondii in a Murine Model During the Acute Phase Through Molecular Detection

Abstract

Congenital infections caused by agents with tropism for the central nervous system may interfere with fetal and neonatal development. In this context, infection by Toxoplasma gondii and Zika virus (ZIKV), either individually or as a coinfection, is relevant due to its potential impacts on neurological development. This study aims to evaluate the effects of congenital infection by *T. gondii*, ZIKV, and coinfection on neonatal development in a murine model. Four groups were established: control, *T. gondii*, ZIKV, and coinfection. Females assigned to *T. gondii* infection were previously infected and, after the chronic phase, subjected to mating. During pregnancy, the ZIKV and coinfection groups received viral inoculation, while the control group received PBS. Postnatal development was monitored from P01 to P12, including assessment of weight gain, general health status, and neurobehavioral tests. So far, litters were obtained from the control, ZIKV, and coinfection groups, and tests of forepaw grasping, righting reflex, negative geotaxis, vibrissae-guided response, and cliff aversion were performed. Preliminary results indicated progressive acquisition of sensorimotor responses. Histological, immunohistochemical, and immunological analyses are ongoing. Continued investigation will allow correlation of behavioral findings with tissue and immunological changes.

Keywords: Toxoplasma gondii; Zika virus; Congenital infection; Murine model.

Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, capaz de infectar diversas espécies de animais homeotérmicos . A infecção por *Toxoplasma gondii* é adquirida principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados formas infectantes do parasito, podendo também ocorrer por transmissão vertical durante a gestação., A infecção adquirida durante esse período apresenta particular relevância em razão dos potenciais efeitos sobre o desenvolvimento fetal (ALMEIDA et al., 2025; SOUZA et al., 2023). Embora a toxoplasmose seja geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, a transmissão congênita pode comprometer diferentes órgãos e sistemas, com destaque para o sistema nervoso central e os olhos (OLIVEIRA et al., 2023).

A toxoplasmose congênita pode apresentar manifestações de diferentes graus de gravidade, incluindo alterações oculares e neurológicas . O acometimento do sistema nervoso central pode estar associado a alterações estruturais e funcionais que repercutem sobre o desenvolvimento motor e outras funções

neurológicas (MURROW et al. 2021). A intensidade e a apresentação dessas manifestações dependem de fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro e ao momento da infecção durante a gestação (ARAUJO et al., 2019).

Entre os patógenos associados às infecções congênitas, destaca-se também o vírus Zika (ZIKV), um arbovírus de RNA de fita simples e sentido positivo, pertencente à família Flaviviridae. Sua transmissão ocorre predominantemente pela picada de mosquitos do gênero Aedes, especialmente Aedes aegypti e Aedes albopictus, mas também pode ocorrer por transmissão vertical durante a gestação (LEÃO et al., 2020). O ZIKV apresenta marcado neurotropismo durante o desenvolvimento embrionário, podendo infectar células progenitoras neurais e interferir em processos relacionados à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Essas alterações estão associadas a comprometimentos do desenvolvimento cerebral e a manifestações neurológicas congênitas (LEÃO et al., 2020; VHP et al., 2020). .

A toxoplasmose congênita e a infecção congênita pelo ZIKV compartilham, portanto, a capacidade de afetar o sistema nervoso em desenvolvimento, embora apresentem mecanismos de interação parasito-hospedeiro distintos. . Ambas as infecções estão inseridas em um espectro de agentes patogênicos historicamente agrupados sob o acrônimo TORCH, termo que engloba o Toxoplasma gondii e patógenos que causam outras infecções (sífilis, hepatite B), rubéola, citomegalovírus e herpes simples, produzindo manifestações clínicas semelhantes. Atualmente, o ZIKV é reconhecido ao lado dos agentes TORCH como uma das principais causas de deficiências neurodesenvolvimentais permanentes em todo o mundo.

A comparação entre essas condições experimentais, no modelo de coinfecção, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no comprometimento neurológico associado às infecções congênitas. Além disso, a investigação da coinfecção permite avaliar se a presença simultânea de diferentes agentes neurotrópicos modifica a resposta do hospedeiro e os desfechos associados ao desenvolvimento neonatal (OSTRANDER; BALE, 2019).

Nesse contexto, modelos murinos constituem ferramentas importantes para investigar os mecanismos associados às infecções congênitas, possibilitando a integração de avaliações comportamentais, histopatológicas e imunológicas. A análise conjunta desses parâmetros poderá contribuir para determinar se a infecção por *T. gondii*, pelo ZIKV ou por ambos os agentes está associada a alterações distintas no desenvolvimento dos neonatos.

Metodologia

Todos os experimentos realizados no LabMat estão em conformidade com o CEUA, sob Certificado N° 459.041/2025.

O presente estudo foi desenvolvido utilizando camundongos BALB/c como modelo experimental. O delineamento foi estruturado em quatro grupos experimentais de fêmeas: (i) controle/não infectado, (ii) infectado/*T. gondii*, (iii) infectado/ZIKV e (iv) coinfectados. O plano de trabalho, inicialmente direcionado à investigação da patogênese cerebral e da resposta do hospedeiro à infecção por *T. gondii*, foi ampliado durante sua execução para incorporar a avaliação da infecção congênita pelo ZIKV e da coinfecção, incluindo abordagens neurocomportamentais, imunológicas e histopatológicas.

As fêmeas dos grupos *T. gondii* e coinfecção foram infectadas por via oral (per gavage) com 15 cistos tissulares da cepa tipo II ME49 de T. gondii, em volume de 200 mL e mantidas pelo período necessário ao estabelecimento da fase crônica da infecção. Posteriormente, os animais foram submetidos ao acasalamento. Após a confirmação da gestação, as fêmeas dos grupos ZIKV e coinfecção receberam inoculação intraperitoneal de 10^5 PFU de ZIKV. As fêmeas do grupo controle receberam PBS pela mesma via, permitindo controlar possíveis efeitos associados ao procedimento de inoculação e à manipulação experimental.

Protocolo de acasalamento e obtenção das ninhadas

Após o estabelecimento da fase crônica da infecção por *T. gondii*, as fêmeas foram submetidas ao protocolo de acasalamento. Os machos foram previamente ambientados e, entre 24 e 48 horas antes da introdução dos machos, foi adicionada maravalha proveniente de suas caixas às caixas das fêmeas, com o objetivo de favorecer a sincronização do ciclo estral. Posteriormente, os machos foram introduzidos nas gaiolas experimentais por aproximadamente 24 horas. A ocorrência de cópula foi verificada pela presença do plug vaginal. A evolução da gestação foi acompanhada por meio do monitoramento periódico do peso corporal das fêmeas. Até o momento, foram iniciadas quatro baterias de acasalamento para obtenção das ninhadas necessárias ao desenvolvimento do estudo. Os protocolos de acasalamento e monitoramento gestacional foram baseados em metodologias previamente descritas na literatura para modelos murinos com modificações.

Até a presente data, foram iniciadas quatro baterias de acasalamento para a obtenção das ninhadas experimentais necessárias ao desenvolvimento do estudo, conforme quadro abaixo.

Avaliação do Desenvolvimento Neonatal

O acompanhamento do desenvolvimento pós-natal dos neonatos foi conduzido de forma contínua ao longo dos primeiros doze dias de vida (P01 a P12), integrando a medição diária do ganho ponderal em gramas, a checagem do estado geral de saúde (Health Score) e a aplicação dos testes neurocomportamentais. Foram empregados testes destinados à avaliação de respostas sensório-motoras e do desenvolvimento neurológico, incluindo Preensão palmar (Palmar grasp reflex), Reflexo de endireitamento ou decúbito (Righting reflex recovery), Geotropismo negativo ou rampa (Negative geotaxis), Reflexo Sensório-Motor pelas vibrissas (Tactile/whisker-guided placing) e o teste

de Aversão ao precipício (Cliff aversion). Cada teste neurocomportamental avaliou parâmetros fisiológicos específicos do desenvolvimento sensório-motor e da integridade neurológica. A preensão palmar foi utilizada para avaliar a resposta reflexa dos membros anteriores diante de estímulo tátil. O reflexo de endireitamento avaliou a capacidade do neonato de retornar à posição ventral após ser colocado em decúbito dorsal. O teste de geotropismo negativo avaliou a capacidade de orientação corporal em uma superfície inclinada. A resposta orientada pelas vibrissas avaliou a resposta sensório-motora desencadeada por estímulo tátil na região das vibrissas. Por fim, o teste de aversão ao precipício avaliou a resposta de esquiva diante de uma situação de potencial queda.

Coleta e processamento do tecido encefálico

Após o período experimental, os animais foram submetidos à perfusão e coleta dos encéfalos. Os tecidos coletados foram armazenados e posteriormente submetidos a cortes seriados em criostato, e as secções obtidas foram montadas em lâminas e destinadas à análise imuno-histoquímica.

Como etapas subsequentes, serão realizadas as análises imunológicas, incluindo a avaliação de anticorpos e citocinas por ELISA, além das avaliações histológicas e imuno-histoquímicas. Essas análises serão utilizadas para caracterizar possíveis alterações associadas às diferentes condições experimentais.

Resultados e Discussões

Até o momento, foram realizadas as principais etapas iniciais do protocolo experimental, incluindo a infecção das fêmeas experimentais, o acasalamento, a obtenção das ninhadas e a avaliação neurocomportamental dos neonatos.

Nas baterias de acasalamento em que houve prenhez efetiva, foram obtidas seis ninhadas a partir das fêmeas grávidas, distribuídas conforme a condição experimental. Na condição controle (não infectada), obtiveram-se seis filhotes provenientes da fêmea C2 e oito da fêmea C3; da infecção por ZIKV, registraram-se nove filhotes da fêmea ZIKV 4 e onze da fêmea ZIKV 2; por fim, na coinfecção (*T. gondii* + ZIKV), contabilizaram-se dez filhotes da fêmea Coinfecção 2 e cinco da fêmea Coinfecção 4. Esses dados demonstram a obtenção de ninhadas experimentais nas condições avaliadas, embora a casuística ainda esteja em formação e deva ser ampliada para a conclusão do delineamento experimental.

A avaliação primária do desenvolvimento neurocomportamental revelou um padrão consistente de aquisição de reflexos sensório-motores e respostas de esquiva ao longo do período pós-natal (P01 a P12) em todas as ninhadas analisadas. Os reflexos de Preensão Palmar (PG) e Endireitamento (DR) apresentaram positivação precoce em todos os grupos, estabelecendo-se entre

P02 e P03, evidenciando a integridade do arco reflexo e do controle motor primário.

À medida que o desenvolvimento prosseguiu, observou-se o surgimento das respostas integrativas mais complexas. O reflexo de Geotaxia Negativa (NG) e a resposta pelas Vibrissas (PV) positivaram em um intervalo intermediário, situando-se predominantemente entre P04 e P06 para todas as ninhadas.

Por fim, o reflexo da Aversão ao Precipício (BH) configurou-se como a última habilidade neurocomportamental a ser adquirida. Todos os grupos mantiveram respostas negativas durante os primeiros dias, com a consolidação da esquiva ocorrendo de maneira homogênea entre P06 e P09 em todas as condições experimentais (Controles, ZIKV e Coinfecções), confirmando o amadurecimento gradativo da percepção espacial e de profundidade.

As análises laboratoriais do tecido encefálico encontram-se em andamento. A avaliação histológica e imuno-histoquímica permitirá investigar possíveis alterações estruturais e da resposta imune no encéfalo, enquanto a análise de anticorpos e citocinas por ELISA permitirá caracterizar componentes da resposta imunológica sistêmica. A integração desses dados com os resultados neurocomportamentais será fundamental para determinar se alterações imunológicas ou histopatológicas estão associadas a modificações do desenvolvimento neonatal.

Adicionalmente, a comparação entre os grupos controle, *T. gondii*, ZIKV e coinfecção permitirá avaliar de maneira mais abrangente os efeitos individuais e combinados dos agentes infecciosos. Dessa forma, a continuidade do estudo será necessária para determinar se a coinfecção modifica o perfil observado nas infecções isoladas e para investigar os possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações.

Conclusão

O presente trabalho permitiu estabelecer e executar as principais etapas de um modelo murino destinado à investigação dos efeitos da infecção congênita por T. gondii, pelo ZIKV e pela coinfecção sobre o desenvolvimento neonatal. As atividades desenvolvidas contribuíram para o andamento do projeto de iniciação científica e permitiram a aquisição de experiência em técnicas experimentais envolvendo modelos murinos.

Até o momento, foram obtidas ninhadas experimentais e realizados testes neurocomportamentais durante os primeiros 12 dias de vida, permitindo caracterizar, de forma preliminar, a aquisição progressiva de respostas sensório-motoras nos neonatos avaliados.

Os resultados disponíveis nesta etapa possuem caráter descritivo e ainda não permitem estabelecer diferenças entre os grupos experimentais ou atribuir alterações específicas à infecção ou à coinfecção. A ampliação da casuística e a conclusão das análises histológicas, imuno-histoquímicas e imunológicas serão fundamentais para uma interpretação integrada dos efeitos das diferentes condições experimentais.

Nas etapas futuras, a associação entre os dados neurocomportamentais, histopatológicos e imunológicos permitirá investigar se a infecção por T. gondii e pelo ZIKV, isoladamente ou em associação, está relacionada a alterações na resposta imune e no desenvolvimento do sistema nervoso. Dessa forma, a continuidade do estudo poderá contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos nas repercussões da infecção congênita e da coinfecção sobre o desenvolvimento neurológico neonatal.

Referências

Souza JS, Farani PSG, Ferreira BIS, Barbosa HS, Menna-Barreto RFS, Moreira OC and Mariante RM (2023) Establishment of a murine model of congenital toxoplasmosis and validation of a qPCR assay to assess the parasite load in maternal and fetal tissues. Front. Microbiol. 14:1124378. doi: 10.3389/fmicb.2023.1124378

ALMEIDA, Roberta Rassi; CAMPOS, Geovana Batista de; CASTRO, Ana Maria. Congenital toxoplasmosis in infants from chronically infected mothers: report of two cases. Revista Paulista de Pediatria (RPPed), São Paulo, v. 43, e2024120, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1984-0462/2025/43/2024120.

Oliveira GKA, Ferreira SRR, Moura VOL, Siqueira VS, Reis TSA, Bridi V, Cardoso LPV, Rezende HHA. Biological screening for congenital toxoplasmosis in newborns from Jataí, Goiás, Brazil: a cross-sectional study. Rev Esc Enferm USP.2024;58:e20230408.https://doi.org/10.1590/1980-220X-REEUSP-2023-0408pt

Goldberg-Murow M, Cedillo-Pela´ ez C, Concha-del-Rı´o LE, Cheja-Kalb R, Salgar-Henao MJ, Orozco-Velasco E, Luna-Paste´ n H, Go´ mez-Cha´ vez F, Ibarra A and Correa D (2021) Autoantibodies Against Ubiquitous and Con ned Antigens in Patients With Ocular, Neuro-Ophthalmic and Congenital Cerebral Toxoplasmosis. Front. Immunol. 12:606963. doi: 10.3389/fimmu.2021.606963

ARAUJO, Isabella Ribeiro et al. Déficits motores e preditores de perda de mobilidade ao final da internação em indivíduos com neurotoxoplasmose.

Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 360-366, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-2950/18017926042019.

Vhp, L., Aragão, M. M., Pinho, R. S., Hazin, A. N., Paciorkowski, A. R., Penalva de Oliveira, A. C., & Masruha, M. R. (2020). Congenital Zika Virus Infection: a Review with Emphasis on the Spectrum of Brain Abnormalities. Current neurology and neuroscience reports, 20(11), 49. https://doi.org/10.1007/s11910-020-01072-0

Santana, L.M.B.; de Moura, I.A.; Mouzinho Ramos Tanaka, Y.; França, R.F.d.O. Zika Virus: A Review of Biology, Clinical Impacts, and Coinfections. Viruses 2025, 17, 637. https://doi.org/10.3390/v17050637

Ostrander, B., & Bale, J. F. (2019). Congenital and perinatal infections. Handbook of clinical neurology, 162, 133–153. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00006-0

Anexos



Tabela referente a metodologia do protocolo de acasalamento e obtenção das ninhadas

CÓDIGO: SB0737

AUTOR: FLÁVIA LETÍCIA SILVA DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: DANIEL MARQUES DE ALMEIDA PESSOA

TÍTULO: Função da coloração de borboletas potiguares

Resumo

A cor da estrutura alar das borboletas, pode estar relacionada às condições ambientais, influenciando processos como termorregulação, camuflagem e comunicação. Neste trabalho, averiguou-se a relação entre a coloração das asas e o tipo de habitat em áreas de Mata Atlântica, considerando ambientes de vegetação aberta e fechada. Com este objetivo, foram utilizados dados de coloração obtidos por espectrofotometria, a partir dos quais foi calculada a variável de brilho das asas. As informações de coloração foram associadas à ocorrência das espécies nos diferentes tipos de habitat, permitindo avaliar se o brilho das asas estaria relacionado à probabilidade de ocorrência em ambientes abertos. Foi ajustado um modelo de regressão logística binomial, onde o tipo de habitat foi a variável resposta e o brilho a variável explicativa. A significância do modelo foi avaliada por meio do teste da razão de verossimilhança, baseado na distribuição do qui-quadrado. Os resultados não indicaram relação significativa entre as variáveis. Sendo assim, embora divergências nas condições ambientais entre habitats possam exercer influência na coloração em lepidópteros, os dados analisados neste estudo não evidenciaram uma associação significativa com o número de indivíduos utilizados.

Palavras-chave: Lepidópteros; cor; brilho; melanismo; Mata Atlântica; microhabitat.

TITLE: Function of coloration in butterflies from Rio Grande do Norte

Abstract

The coloration of butterfly wing structures may be related to environmental conditions, influencing processes such as thermoregulation, camouflage, and communication. In this study, we investigated the relationship between wing coloration and habitat type in areas of the Atlantic Forest, considering open and closed vegetation environments. For this purpose, coloration data obtained through spectrophotometry were used to calculate wing

brightness. Coloration data were associated with species occurrence in different habitat types, allowing us to assess whether wing brightness was related to the probability of occurrence in open environments. A binomial logistic regression model was fitted, with habitat type as the response variable and brightness as the explanatory variable. Model significance was assessed using a likelihood ratio test based on the chi-square distribution. The results did not indicate a significant relationship between the variables. Therefore, although differences in environmental conditions among habitats may influence coloration in lepidopterans, the data analyzed in this study did not show a significant association with the number of individuals sampled.

Keywords: Lepidoptera;color; brightness; melanism; Atlantic Forest; microhabitat

Introdução

As borboletas são importantes bioindicadoras da estabilidade de um ecossistema (Marques et. al, 2016) e ótimos modelos para o estudo de cores, que permitem entender quais forças de seleção atuam sobre elas (Endler 1982; Andersson 1994). Padrões de cores semelhantes, visualizados em espécies distintas, podem resultar da evolução convergente por pressões ambientais parecidas (Hoekstra 2006). Os padrões de cores das asas são construídos por mecanismos físicos e pigmentos, como a melanina (Watt 1964), e podem exercer um papel na seleção sexual (Wiernasz 1995), termorregulação (Clusella-Trullas, van Wyk, & Spotila 2007), evitar predação (Kettlewell 1955) e parasitas (True 2003), assim como na prevenção contra dessecação e danos UV (Majerus 1998).

A melanina, presente nas escamas, contribui para a formação de colorações mais escuras e para a absorção da radiação incidente (Shawkey et al., 2009). Além de sua contribuição na sinalização visual e camuflagem, o pigmento das asas pode estar relacionado à regulação térmica, considerando que a melanização tende a influenciar a quantidade de radiação absorvida e a aquisição de calor (Liao et al., 2019; Rosa et al., 2020). Dessa maneira, a variação na cor das estruturas alares pode estar associada às condições térmicas dos diferentes micro-habitats ocupados pelas borboletas.

A Mata Atlântica é um domínio geográfico reconhecido como hotspot mundial de biodiversidade e possui alto nível de endemismo. Apesar de sua importância ecológica, o bioma encontra-se severamente fragmentado devido aos processos históricos de ocupação e uso da terra, restando aproximadamente 11,7% de sua cobertura vegetal original (Ribeiro et al., 2009). Este bioma abrange diferentes formações vegetais, entre elas a Floresta Ombrófila Densa e a Restinga. A Floresta Ombrófila Densa caracteriza-se por uma formação majoritariamente arbórea, com alta disponibilidade de umidade, relacionada a fatores climáticos, como temperatura e umidade relativa do ar (Blum; Roderjan; Galvão, 2011). Alternativamente, a Restinga é composta de ecossistemas costeiros, desenvolvidos sobre solos arenosos, sob influência de salinidade, ventos, radiação solar e dinâmica sedimentar (Rabelo; Fernandes; Moro, 2024; Gomes et al., 2022). Dessa forma, a estrutura da vegetação contribui para a formação de aspectos ambientais distintos no interior da mata, especialmente em relação à incidência de luz, resultando em espaços micro climaticamente singulares (Falkenberg, 1999).

As características ambientais podem afetar a evolução e a expressão de diferentes padrões de cor, visto que transformam as condições de iluminação e características físicas onde os organismos habitam. A composição espectral da luz tende a variar conforme a estrutura vegetativa, em especial florestas, pois a passagem da radiação pelas árvores altera como os comprimentos de onda atingem o sub-bosque (Endler, 1993). Com isso, diferenças na estrutura dos micro-habitats contribuem na variação de coloração das comunidades de lepidópteros, seja por influência na termorregulação ou pela alteração do ambiente visual no qual os indivíduos interagem.

Embora os padrões de cor de lepidópteros sejam mais amplamente estudados em regiões Paleártica, Neártica e Australiana, ainda se vê a necessidade de estudos que investiguem a relação entre a coloração de borboletas e os aspectos de ambiente em comunidades neotropicais. Nessa perspectiva, o presente estudo tem como objetivo compreender se a coloração das asas das borboletas varia entre diferentes micro-habitats da Mata Atlântica do Rio Grande do Norte, considerando a viabilidade de pigmento estar relacionado às condições do ambiente e atuar como uma estratégia adaptativa de termorregulação. É esperado que espécies associadas a cenários com maior cobertura vegetal apresentem menor brilho e maior melanismo nas asas, enquanto as encontradas em locais menos sombreados apresentem maior brilho e menor melanismo.

Metodologia

Para avaliar a possível relação entre a coloração das asas e a ocorrência das espécies, em distintas condições de habitat, o estudo focou em espécies de borboletas registradas em áreas de Mata Atlântica, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil (Figura 1). A Mata Atlântica potiguar configura-se atualmente em fragmentos, distribuindo-se ao longo da faixa litoral do estado.

As bases utilizadas neste trabalho foram adquiridas através da combinação de dois estudos anteriormente publicados:Melanism and color saturation of butterfly assemblages: A comparison between a tropical rainforest and a xeric white forest (Schirmer et al., 2023) e Relação entre tamanho, coloração e ocorrência de borboletas em diferentes microhabitats de biomas nordestinos (Assis et al., 2023).Do primeiro estudo, foram extraídas informações espectrofotométricas associadas às asas.O segundo, providenciou dados referentes à localização dos organismos, em diferentes condições de habitat, permitindo sua classificação quanto à estruturação do meio.Com base nas listas de lepidópteros presentes em ambas as pesquisas, foi realizada uma correspondência entre elas, levando em consideração somente as espécies que ocorrem na região da Mata Atlântica potiguar e presentes simultaneamente nos dois trabalhos. A correlação entre as listas resultou em 37 espécies, que posteriormente, essas informações espectrofotométricas e de ambiente, foram combinadas em uma única planilha.

Para analisar a relação entre o brilho das asas e a ocorrência dos indivíduos em habitats abertos, foi utilizado um modelo de regressão logística binomial, onde a variável resposta foi o tipo de habitat, classificado como fechado (0) ou aberto (1). Ambientes determinados como fechados, foram representados pela floresta densa, enquanto habitats vinculados a bordas, clareiras e áreas abertas, foram categorizados como abertos.O brilho médio do

dorso das asas por indivíduo, foi utilizado como variável explicativa contínua, valores que foram obtidos a partir das análises de coloração, processadas no pacote pavo, no software R, onde foi obtido o cálculo do valor médio de brilho para cada indivíduo.Para testar a significância do da análise,foi utilizado o teste de razão de verossimilhança (Likelihood Ratio Test), que faz comparação entre o modelo contendo a variável explicativa e o modelo nulo, utilizando a distribuição qui-quadrado como referência,para averiguar se a inclusão da variável explicativa evidencia uma melhora significativa no ajuste deste modelo.Todas as análises foram realizadas no programa R, versão 4.4.1.

Resultados e Discussões

Resultados

A regressão logística binomial não identificou efeito estatisticamente significativo do brilho sobre a probabilidade de ocorrência em habitat aberto ($\beta = 2{,}95 \times 10^{-15}$; EP = $2{,}70 \times 10^{-15}$; z = 1,095; p = 0,274), nos 37 indivíduos analisados (Figura 2). O teste de razão de verossimilhança também não apontou melhora significativa do ajuste do modelo, após a inclusão da variável brilho ($\chi^2 = 1{,}193$; gl = 1; p = 0,275). A deviance foi reduzida de 35,893, no modelo nulo, para 34,700, no modelo contendo a variável brilho. O intervalo de confiança de 95% para o coeficiente do brilho variou de $-2{,}44 \times 10^{-15}$ a $8{,}53 \times 10^{-15}$. O modelo apresentou AIC de 38,70.

Discussão

Os resultados não apresentam evidências suficientes para corroborar que a variação da luminosidade das asas esteja diretamente ligada ao tipo de área de ocorrência considerada nesta pesquisa. Entretanto, o modelo apresentou uma estimativa positiva para a variável brilho, apontando uma tendência no aumento da probabilidade estimada de presença em habitats abertos, à medida que os valores de brilho também aumentaram.Embora essa tendência não seja corroborada estatisticamente,pode ser relevante como um indício para futuras avaliaçõesenglobando um maior número de indivíduos.

A trajetória observada no presente estudo é majoritariamente similar a evidências de que a coloração das borboletas pode se modificar conforme as condições ecológicas e com a estrutura do nicho.Foi observado que comunidades de borboletas em habitats de floresta fechadapossuíam um menor brilho em comparação aquelas associadas a ambientes abertos (Cheng et al. 2018).

Em nível de pequenas áreas,pesquisas também têm mostrado que a disponibilidade de luz solar e as condições térmicas, podem estar relacionadasà variação na luminosidade da fauna lepidoptera. O estudo de Xing et al. (2016), realizado em florestas tropicais australianas, demonstrou que habitats mais frios abrigavamborboletas maiores e mais escuras, como tambémidentificou divergências na intensidade luminosa dos animais associados a condições de sol e sombra dentro de ambientes de mata.Os pesquisadores destacam que a heterogeneidade do ambiente em locais fechados, pode resultar em

distintas condições de temperatura e radiação solar em pequena escala, que potencialmente influenciam características relacionadas à coloração.

Por serem indivíduos ectotérmicos, sua temperatura corporal e atividade dependem do nível térmico do ambiente,podendo ser moldadas por características comportamentais, fisiológicas e fenotípicas. Dessa maneira, alterações na temperatura e na disponibilidade de microhabitats adequados, tendem a influenciar diretamente a distribuição, o comportamento e a permanência das espécies.Lepidópteros são utilizados amplamente como bioindicadores, considerando a sua sensibilidade às mínimas alterações da natureza. Com isso, o entendimento de como diferentes espécies utilizam os nichos para termorregular,pode favorecer na identificação de comunidades mais vulneráveis às alterações climáticas, além de disponibilizar conhecimento de conservação e manejo. Levando em consideração os cenários esperados das mudanças climáticas sobre o estado térmico, pesquisas que incorporem coloração, comportamento termorregulatório e características do microhabitat, são importantes para compreender e prever possíveis respostas da fauna lepidoptera às mudanças ambientais eventuais.

Conclusão

Não foi detectada associação significativa entre o brilho das asas e a ocorrência de borboletas em habitats abertos, entretanto tenha sido observada uma tendência positiva. Esse padrão pode estar relacionado à influência das condições ambientais sobre características de coloração e termorregulação, sendo necessários trabalhos com maior esforço amostral para avaliar essa relação.

Referências

ANDERSSON, M. Sexual selection. Princeton: Princeton University Press, 1994.

ASSIS, Pueblo Pêblo Batista de Araújo; FIGUEIREDO, Lucas da Rocha; SCHIRMER, Sofia Coradini; PESSOA, Daniel Marques de Almeida. Relação entre microhabitat e coloração de borboletas de dois biomas nordestinos. In: ENCONTRO DE ZOOLOGIA DO NORDESTE, 21., 2023, Recife. Anais [...]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

BLUM, C. T.; RODERJAN, C. V.; GALVÃO, F. O clima e sua influência na distribuição da Floresta Ombrófila Densa na Serra da Prata, Morretes, Paraná. Floresta, Curitiba, v. 41, n. 3, p. 589–598, 2011. DOI: https://doi.org/10.5380/rf.v41i3.24052.

CHENG, W.; XING, S.; CHEN, Y.; LIN, R.; BONEBRAKE, T. C.; NAKAMURA, A. Dark butterflies camouflaged from predation in dark tropical forest understories.

Ecological Entomology, v. 43, n. 3, p. 304–309, 2018. DOI: https://doi.org/10.1111/een.12499.

ENDLER, J. A. Signals, signal conditions, and the direction of evolution. The American Naturalist, v. 139, n. 5, p. S125–S153, 1992. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/2462431.

ENDLER, J. A. The color of light in forests and its implications. Ecological Monographs, v. 63, n. 1, p. 1–27, 1993. DOI: https://doi.org/10.2307/2937121.

FALKENBERG, D. B. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. Insula: Revista de Botânica, Florianópolis, n. 28, p. 1–30, 1999.

HOEKSTRA, H. E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. Heredity, v. 97, n. 3, p. 222–234, 2006. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800861.

KETTLEWELL, H. B. D. Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. Heredity, v. 9, p. 323–342, 1955. DOI: https://doi.org/10.1038/hdy.1955.36.

LIAO, H.; DU, T.; ZHANG, Y.; SHI, L.; HUAI, X.; ZHOU, C.; DENG, J. Capacity for heat absorption by the wings of the butterfly Tirumala limniace (Cramer). PeerJ, v. 7, e6648, 2019. DOI: https://doi.org/10.7717/peerj.6648.

MARQUES, M. S.; FARIA, K. C. P. de; MIRANDA, P. Levantamento de lepidópteros (borboletas e mariposas) no Horto Florestal Parque Monteiro Lobato de Muriaé, MG. Revista Científica da FAMINAS, v. 3, n. 2, 2016. Disponível em: https://periodicos.faminas.edu.br/index.php/RCFaminas/article/view/195.

RABELO, S. T.; FERNANDES, M. F.; MORO, M. F. Biogeography of restinga vegetation in Northern and Northeastern Brazil and their floristic relationships with adjacent ecosystems. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 96, n. 2, e20230925, 2024. DOI: https://doi.org/10.1590/0001-3765202420230925.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021.

ROSA, E.; SAASTAMOINEN, M. Beyond thermal melanism: association of wing melanization with fitness and flight behaviour in a butterfly. Animal Behaviour, v. 167, p. 275–288, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.07.015.

SCHIRMER, S. C.; GAWRYSZEWSKI, F. M.; CARDOSO, M. Z.; PESSOA, D. M. A. Melanism and color saturation of butterfly assemblages: a comparison between a tropical rainforest and a xeric white forest. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 11, 932755, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fevo.2023.932755.

SHAWKEY, M. D.; MOREHOUSE, N. I.; VUKUSIC, P. A protean palette: colour materials and mixing in birds and butterflies. Journal of the Royal Society Interface, v. 6, supl. 2, p. S221–S231, 2009. DOI: https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0459.

TRUE, J. R. Insect melanism: the molecules matter. Trends in Ecology & Evolution, v. 18, n. 12, p. 640–647, 2003. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.09.006.

WATT, W. B. Pteridine components of wing pigmentation in the butterfly Colias eurytheme. Nature, v. 201, p. 1326–1327, 1964. DOI: https://doi.org/10.1038/2011326b0.

WIERNASZ, D. C. Male choice on the basis of female melanin pattern in Pieris butterflies. Animal Behaviour, v. 49, n. 1, p. 45–51, 1995. DOI: https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)80152-9.

XING, S.; BONEBRAKE, T. C.; TANG, C. C.; PICKETT, E. J.; CHENG, W.; GREENSPAN, S. E.; WILLIAMS, S. E.; SCHEFFERS, B. R. Cool habitats support darker and bigger butterflies in Australian tropical forests. Ecology and Evolution, v. 6, n. 22, p. 8062–8074, 2016. DOI: https://doi.org/10.1002/ece3.2464

Anexos



Figura 1: Mata Atlântica do Estado do Rio Grande do Norte. Fonte: Adaptado de Diniz e Oliveira (2018)



Figura 2: Relação entre o brilho médio das asas e a probabilidade estimada de ocorrência em habitat aberto, obtida por meio de regressão logística binomial. Os pontos representam as borboletas, registradas em habitat fechado (0) ou aberto (1).

CÓDIGO: SB0747

AUTOR: MARIA EDUARDA ARRAIS DA SILVA DE MEDEIROS

ORIENTADOR: JANINE KARLA FRANCA DA SILVA BRAZ

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do plasma atmosférico frio sobre fibroblastos no contexto de Anemia de Fanconi

Resumo

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética hereditária rara, multissistêmica que possui maior predisposição de desenvolvimento de neoplasias, principalmente o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Esses pacientes apresentam hipersensibilidade aos efeitos genotóxicos da radioterapia e quimioterapia. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do plasma atmosférico frio sobre os fibroblastos no contexto da anemia de Fanconi, estabelecendo inicialmente protocolos experimentais em linhagem celular fibroblástica de murino (3T3). Para isso, foi cultivada a linhagem 3T3 até a formação da monocamada. Posteriormente, foram tratadas com o plasma atmosférico frio (CAP) sob uma vazão de gás hélio nas doses definidas (60 segundos, 90 segundos, 120 segundos) para avaliar viabilidade e proliferação celular pelo ensaio Alamar Blue. Os resultados do Alamar Blue revelaram que a atividade metabólica foi maior em 24 horas de incubação, especialmente a dose de 60 segundos. Além disso, nenhuma das outras doses ao longo do tempo de incubação apresentou citotoxicidade. Dessa forma, tendo em vista os resultados encontrados, o estudo sobre os efeitos do CAP amplia as possibilidades terapêuticas minimamente invasivas para os pacientes com AF que apresentam a hipersensibilidade aos tratamentos oncológicos convencionais.

Palavras-chave: Plasma Atmosférico Frio. Espécies Reativas de Oxigênio. Cicatrização

TITLE: Evaluation of the effects of cold atmospheric plasma on fibroblasts in the context of Fanconi anemia

Abstract

Fanconi anemia (FA) is a rare, multisystemic, hereditary genetic disorder associated with an increased predisposition to developing neoplasms, particularly head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). These patients exhibit hypersensitivity to the genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of cold atmospheric plasma (CAP) on fibroblasts in the context of Fanconi anemia, initially establishing experimental protocols using a murine

fibroblast cell line (3T3). To this end, the 3T3 cell line was cultured until a monolayer formed. Subsequently, the cells were treated with CAP using a helium gas flow at specific exposure times (60, 90, and 120 seconds), and cellular viability was assessed using the Alamar Blue assay. The Alamar Blue results revealed higher metabolic activity after 24 hours of incubation, particularly with the 60-second exposure. Furthermore, none of the other exposure times showed cytotoxicity during the incubation period. Thus, given these findings, research into the effects of CAP expands the range of minimally invasive therapeutic options for FA patients who exhibit hypersensitivity to conventional oncological treatments.

Keywords: Cold Atmospheric Plasm. Reactive Oxygen Species. Wound Healing

Introdução

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética hereditária rara, multissistêmica caracterizada pela insuficiência progressiva da medula óssea, anomalias congênitas e maior predisposição de desenvolvimento de tumores malignos decorrente da instabilidade genômica pela falha nos mecanismos reparadores do DNA (HOOVER et al., 2024). Entre as neoplasias, destaca-se o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), os quais representam o tipo mais frequente de câncer sólido nesses pacientes com AF uma vez que apresentam risco de desenvolver em até 700 vezes maior em comparação com a população em geral (BERTOLA et al., 2022; KUTLER et al., 2003). Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo responsáveis pela síntese de matriz extracelular, essenciais nos processos de cicatrização (PLIKUS MV et al., 2021). Para estudar esse processo em razão da deficiência no gene FANCC, foi estabelecida as linhagens celulares PD331: de fibroblastos modificados referentes a Anemia de Fanconi com mutação no gene FANCC. Essa linhagem apresenta defeitos na reparação do DNA, instabilidade genômica, além do acúmulo anormal de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma deficiência na resposta antioxidante celular (PEAKE, NOGUCHI, 2022; SHARMA et al., 2022). Entretanto, há carência de estudos sobre o condicionamento e avaliação das doses terapêuticas do CAP nas linhagens fibroblásticas de murinos e dos pacientes com AF. Por isso, serão estabelecidos esses critérios na linhagem celular 3T3 de fibroblastos de murino e posteriormente avaliado em linhagem celular com deficiência no gene FANCC O tratamento convencional baseado em radioterapia e quimioterapia para pacientes oncológicos apresenta limitações para os pacientes com Anemia de Fanconi que desenvolvem HNSCC, visto que possuem hipersensibilidade aos efeitos genotóxicos da radiação e de diversos agentes citotóxico gerados pela ionização direta do DNA e na produção de radicais livres (DEPTULA et al, 2018). A exposição à radioterapia ocasiona também uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias, podendo comprometer a interação célula-célula e célula-matriz, decomposição da matriz e fibrose, prejudicando o processo de cicatrização desses pacientes oncológicos (DEPTULA et al, 2018). No entanto, é necessário estabelecer a dose terapêutica para o tipo celular e o tecido alvo desses pacientes oncológicos com Anemia de Fanconi. Pensando nisso, o uso de plasma atmosférico frio (CAP) apresenta-se como uma boa alternativa terapêutica para esses pacientes, uma vez que, a partir da proliferação de fibroblastos e queratinócitos, possui papel benéfico no processo cicatricial de feridas (BRANỲ et al, 2020). O CAP também tem demonstrado um potencial promissor em aplicações oncológicas, visto que apresenta seletividade pelas células tumorais a partir da deposição de espécies reativas de oxigênio (EROS),

causando estresse oxidativo nas células cancerígenas (MALI, 2023). Dessa forma, esse trabalho busca avaliar os impactos biológicos do CAP in vitro de linhagem de células fibroblásticas 3T3 sem mutação para anemia de AF a fim de estabelecer protocolos de tratamento do plasma e, posteriormente, aplicá-los em linhagens celulares proveniente de pacientes com Anemia de Fanconi.

Metodologia

2.1 Tratamento do Plasma As amostras foram tratadas por 60, 90 e 120 segundos sob uma vazão de gás hélio, mantendo-se uma distância aproximadamente de 20 mm entre os jatos de plasma e a superfície da amostra, caracterizando uma aplicação direta na cultura celular. 2.2 Cultura Celular A linhagem celular de fibroblastos de camundongo 3T3 e cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO2, e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Após o período de incubação e estabelecimento de monocamada as células aderidas serão removidas por tripsina e cultivadas para realização dos tratamentos e, posteriormente, ensaios experimentais em placas de 24 poços, em concentração de 2x105 ou a 4 células/poço. Em seguida, as células serão analisadas quanto a viabilidade e proliferação, sendo divididas em quatro grupos experimentais: o Grupo I (controle), definido pelas células 3T3 sem tratamento com plasma. Já os grupos II, III e IV foram amostras de 3T3 tratadas com plasma ao longo de 60, 90 e 120 segundos, respectivamente. 2.3 Viabilidade e Proliferação Celular A proliferação celular foi analisada utilizando o ensaio AlamarBlue, que quantifica a atividade metabólica de células viáveis com base na redução de um corante à base de resazurina por enzimas mitocondriais. Essa redução gera um sinal fluorescente ou colorimétrico proporcional ao número de células metabolicamente ativas, com uma maior redução de AlamarBlue indicando maior viabilidade e proliferação celular. Para esta análise, os grupos controle e tratados foram incubados por por 24, 48 e 72 horas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2. Para cada tempo, foi aspirado parcialmente o meio de cultura e adicionado 400 µL de solução de AlamarBlue (Invitrogen, EUA) em cada poço. Posteriormente, as amostras foram incubada por 4 horas para medir a absorbância e calcular a porcentagem do Alamar Blue.

Resultados e Discussões

O ensaio AlamarBlue foi realizado após o tratamento com plasma para avaliar viabilidade e proliferação celular. O experimento foi realizado em triplicata, totalizando 12 amostras nos grupos experimentais (controle, 60 segundos, 90 segundos e 120 segundos). A atividade metabólica foi avaliada em 24, 48 e 72 horas de incubação para monitorar as alterações temporais na viabilidade e proliferação celular. Os resultados mostram que a redução do AlamarBlue foi maior em 24 horas de incubação, especialmente a dose de 60 segundos que apresentou ação metabólica maior em comparação com o controle não tratado e as demais amostras tratadas no mesmo período de incubação. O melhor resultado encontrado em 24 horas de incubação pode ser explicado pela natureza reativa e de curta duração das EROS (BEKESCHUS et al., 2023), além do efeito dose-dependente presente na dose de 60 segundos durante os três

períodos de incubação (Bakhtiyari-Ramezani et al., 2024), evidenciando resultados mais consistente e de maior estabilidade comparada a outras doses. Apesar desse comparativo, nenhuma das outras doses ao longo do tempo apresentou citotoxicidade, uma vez que foi preservado a viabilidade das células quando observado as amostras tratadas (60, 90 e 120 segundos) em relação à amostra controle ao longo de 48 horas - fenômeno semelhantemente observado em 72 horas.

Conclusão

A dose de 60 segundos do tratamento de plasma atmosférico frio apresentou nas células 3T3 ação metabólica positiva, sendo um feito desejável para linhagem celular usada, pois não reduziu sua atividade ao longo das horas quando comparada com seu respectivo grupo controle. Dessa forma, o estudo sobre os efeitos do CAP amplia as possibilidades terapêuticas minimamente invasivas para os pacientes com AF que apresentam a hipersensibilidade aos tratamentos oncológicos convencionais. No entanto, para potencializar essa discussão, faz-se necessário uma avaliação minuciosa dos efeitos do plasma atmosférico frio sobre os fibroblastos sem mutação e com mutação no gene FANCC a partir de outros experimentos, tais como a microscopia eletrônica para observar estruturas celulares em escalas nanométricas, e ensaio apoptótico para quantificação do número de células que sofreram apoptose.

Referências

KUTLER, David I.; AROCHENA, Vivian; WETTER, Donald A.; CARLSON, David L.; WIEGAND, Scott; DEAN, Michael; AJOBO, Hakeem O.; D'ANDREA, Alan D. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery, Chicago, v. 129, n. 1, p. 106–112, 2003. BAKHTIYARI-RAMEZANI, M. et al. Comparative assessment of direct and indirect cold atmospheric plasma effects, based on helium and argon, on human glioblastoma: an in vitro and in vivo study. Scientific Reports, v. 14, n. 1, 13 fev. 2024. BEKESCHUS, S. Medical gas plasma technology: Roadmap on cancer treatment and immunotherapy. Redox biology, v. 65, p. 102798, set. 2023. BERTOLA, Nadia; DEGAN, Paolo; CAPPELLI, Enrico; RAVERA, Silvia. Mutated FANCA gene role in the modulation of energy metabolism and mitochondrial dynamics in head and neck squamous cell carcinoma. Cells, Basel, v. 11, n. 15, p. 2353, 2022. BHANDARI, J.; THADA, P. K.; PUCKETT, Y. Fanconi AnemiaPubMed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559133/>. Acesso em: 19 ago.. 2026. BRANÝ, D. et al. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 8, p. 2932, 22 abr. 2020. DEPTUŁA, M. et al. Wound healing complications in oncological patients: perspectives for cellular therapy. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii, v. 36, n. 2, p. 139–146, 1 abr. 2019. HOOVER, A. et al. Longitudinal clinical manifestations of Fanconi anemia: A systematized review. Blood Reviews, v. 68, p. 101225, nov. 2024. PEAKE, Jasmine D.; NOGUCHI, Eishi. Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. Human Genetics, v. 141, p. 1861–1876, 2022. SHARMA, Preksha; SHARMA, Neha; SHARMA, Dhruva. A

narrative review on Fanconi anemia: genetic and diagnostic considerations. Global Medical Genetics, v. 9, n. 3, p. 237– 241, 2022. LAKSHMANAN, I.; BATRA, S. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. BIO-PROTOCOL, v. 3, n. 6, 2013. LONGHIN, E. M. et al. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. Frontiers in Toxicology, v. 4, 28 set. 2022. Bibliography MALI, S. B. Role of Cold atmospheric plasma in cancer management. Oral Oncology Reports, v. 9, p. 100133, 1 mar. 2024. PEAKE, Jasmine D.; NOGUCHI, Eishi. Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. Human Genetics, v. 141, p. 1861–1876, 2022. SHARMA, Preksha; SHARMA, Neha; SHARMA, Dhruva. A narrative review on Fanconi anemia: genetic and diagnostic considerations. Global Medical Genetics, v. 9, n. 3, p. 237– 241, 2022. PLIKUS, M. V. et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. Cell, v. 184, n. 15, p. 3852–3872, 22 jul. 2021.

CÓDIGO: SB0748

AUTOR: FRED JOSHUA COSTA ROSA

ORIENTADOR: RENATA FIGUEIREDO ANOMAL

TÍTULO: Comportamento social de roedores modelo de autismo tratados com antioxidante durante o desenvolvimento do córtex auditivo: análise de dados

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por um nível variável de comprometimento na comunicação e interação social. Apesar de ser bastante estudada, a etiologia desse transtorno ainda não foi consistentemente explicada. Uma considerável quantidade de estudos associa o TEA a um conjunto de alterações no córtex sensorial durante seu desenvolvimento. Assim, a investigação a respeito da neurobiologia do autismo também consiste em explorar o desenvolvimento de áreas sensoriais durante o período crítico dos córtices correspondentes. Porém, a relação entre estresse oxidativo, o período crítico do córtex auditivo e o comportamento social autístico ainda não é bem conhecida. Abordagens que preencham essas lacunas são importantes para possibilitar intervenções que reduzam os comprometimentos da comunicação e interação social nos indivíduos diagnosticados com TEA. Esse projeto objetivou, então, investigar se os déficits sociais de roedores modelo de autismo (por injeção de ácido valpróico) também seriam acarretados pelo estresse oxidativo durante o período crítico do córtex auditivo primário. Para isso, os animais foram submetidos ao teste de sociabilidade na caixa das 3 câmaras, de modo a permitir comparações entre aqueles tratados com um antioxidante durante o período crítico do córtex e os não tratados. Os resultados parciais apontaram para uma possível melhoria no comportamento de sociabilidade do grupo que recebeu o antioxidante.

Palavras-chave: Autismo. Córtex auditivo. Estresse oxidativo. Sociabilidade.

TITLE: Oxidative Stress During the Critical Period of Postnatal Development and Sociability Behavior in Rodent Models of Autism

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by varying degrees of impairment in communication and social interaction. Despite extensive study, the etiology of this disorder has not yet been consistently explained. A number of studies link ASD to a set of alterations in the sensory cortex during its development. Consequently, research into the neurobiology of autism involves

exploring the development of sensory areas during the critical period of the corresponding cortical regions. However, the relationship between oxidative stress, the critical period of the auditory cortex, and autistic social behavior remains poorly understood. Approaches that address these gaps are crucial for enabling interventions to reduce communication and social interaction impairments in subjects with ASD. This project therefore aimed to investigate whether social deficits in a rodent model of autism (induced by valproic acid injection) might also stem from oxidative stress during the critical period of the primary auditory cortex. To this end, the animals underwent a three-chamber sociability test, allowing for comparisons between those treated with an antioxidant during the cortical critical period and those that were untreated. Preliminary results indicated a possible improvement in the sociability behavior of the group that received the antioxidant.

Keywords: Autism. Auditory cortex. Oxidative stress. Sociability.

Introdução

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por um nível variável de comprometimento na comunicação e interação social, bem como interesses e comportamentos restritos e repetitivos, o que resulta em uma menor capacidade de estabelecer um contato social típico com outras pessoas (Baird et al., 2003; Kanner, 1943). Apesar de ser bastante estudada, a etiologia do autismo ainda não foi consistentemente explicada. Na tentativa de contribuir para o entendimento dessa etiologia, uma considerável quantidade de estudos associa o TEA a um conjunto de alterações no córtex sensorial durante seu desenvolvimento, tendo em vista que anormalidades na percepção sensorial são encontradas em pessoas autistas com frequência (Robertson; Baron-Cohen, 2017; Rosenhall et al., 1999). Deste modo, o foco dessas investigações se volta para o período crítico do neurodesenvolvimento de áreas sensoriais.

O período crítico do neurodesenvolvimento consiste numa fase em que o sistema nervoso é altamente suscetível aos estímulos ambientais (Berardi et al., 2003; Begum et al., 2017). Assim, as influências ambientais durante o período crítico impactam a percepção sensorial na vida adulta. Há evidências consideráveis de que o progresso do período crítico do desenvolvimento pós-natal estaria sendo prejudicado devido a um efeito negativo do desequilíbrio entre estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidantes sobre os interneurônios e a rede perineuronal (Cheng et al., 2017). No entanto, a relação entre o estresse oxidativo, o período crítico do desenvolvimento do córtex auditivo e o comportamento social autístico ainda não é bem conhecida. Para fins de investigar relações dessa natureza, pode-se então recorrer a roedores modelo de autismo, que permitem o estudo das dimensões comportamental, morfológica e fisiológica dos transtornos de neurodesenvolvimento. O modelo roedor de autismo utilizado em nosso estudo envolve a administração de ácido valpróico (VPA) durante o desenvolvimento embrionário de ratos ou camundongos, visando induzir comportamentos autísticos, tendo sido iniciado por Rodier et al. (1996). Em roedores, foi constatado que a administração de VPA por volta do dia embrionário 12 (E12) está associada às alterações neurais e comportamentais do autismo, por estar relacionada ao dia de fechamento do tubo neural (Kataoka et al., 2013; Schneider; Przewłocki, 2005).

Larner et al. (2021) destacam que a dose típica para indução do modelo de autismo é de 500 ou 600 mg/kg.

Utilizando o modelo VPA para estudar o mapa tonotópico, observou-se que tanto o gradiente tonotópico quanto os campos receptores estavam alterados, alterações típicas de quando ocorrem problemas na abertura e fechamento do período crítico de A1 (Anomal et al., 2013; Zhou et al., 2011). Esse achado sugere que alterações sensoriais presentes em roedores VPA são justamente aquelas derivadas de prejuízos no córtex auditivo. Contudo, permanece uma lacuna na relação entre córtices auditivos alterados por estresse oxidativo durante seu período crítico do desenvolvimento e o comportamento social deficitário nos roedores VPA. Para esclarecer essa relação, é essencial analisar o comportamento do modelo de roedor de autismo supramencionado, especialmente no teste de sociabilidade das 3 câmaras (Crawley, 2007). Tais abordagens científicas possibilitam intervenções que reduzam os comprometimentos da comunicação e interação social nos indivíduos diagnosticados com TEA.

O projeto objetivou então avaliar, por meio do teste de sociabilidade, o comportamento social de roedores modelo VPA de autismo tratados com antioxidante durante o período crítico do desenvolvimento do córtex auditivo primário, considerando a hipótese de que os déficits sociais observados no autismo podem ser relacionados ao estresse oxidativo aumentado durante o desenvolvimento dessa região sensorial.

Metodologia

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, explicativa e experimental. Foram utilizados indivíduos da espécie Rattus norvegicus (linhagem Wistar) (CEUA 035/2025), mantidos em gaiolas em uma sala no Biotério da Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, com temperatura, alimentação e umidade controladas. Os ratos utilizados no experimento foram induzidos a apresentar fenótipo comportamental autístico através de exposição embrionária ao ácido valpróico, cuja dose foi de 500 mg/kg, dissolvida em NaCl 0,15 M i.p. O grupo controle recebeu o mesmo volume de solução de veículo (NaCl 0,15 M i.p). A dose foi injetada no dia embrionário 12 (E12). Os testes foram realizados com três grupos experimentais: (1) ratos controles que não foram expostos ao ácido valpróico, ou seja, que não são modelo VPA de autismo - um grupo com 8 animais; (2) ratos modelo VPA de autismo tratados com exossomos sem antioxidante - um grupo com 5 animais; (3) ratos modelo modelo VPA de autismo tratados com exossomos com antioxidante em dosagem de 4 mg/kg - um grupo de 3 indivíduos. O antioxidante utilizado foi o extrato do fruto da planta Libidibia ferrea, que contém antioxidantes flavonóides. No caso dos grupos 2 e 3, os exossomos foram administrados por 3 dias consecutivos, os dias pós-natal 10, 11 e 12 (P10, P11 e P12), considerando o período crítico do córtex auditivo primário para formação tonotópica de P11 e P13 (de Villers-Sidani et al., 2007) e o período entre o início de 1h e o término da liberação do antioxidante pelo exossomo de 24 horas (Choi et al., 2022).

Os animais foram analisados a partir do P30. Para isso, utilizou-se uma caixa de 3 câmaras, para aplicação do teste de sociabilidade. O aparato utilizado para o teste era uma caixa retangular de acrílico na cor preta e composta por 3 câmaras, com abertura

entre elas. Neste teste, o rato era exposto a um rato conhecido em uma gaiola cilíndrica de acrílico localizada na câmara direita e uma gaiola acrílica vazia da câmara esquerda (objeto). A câmara central não apresentava nenhum rato nem gaiola. No dia anterior ao experimento, os ratos eram levados à sala do experimento por 30 minutos em suas gaiolas, para depois passarem pelo processo de habituação. A habituação consistiu em duas sessões de 5 minutos para cada rato explorar o aparato. No dia seguinte, após 30 minutos na gaiola dentro da sala, cada rato realizou uma sessão de 10 minutos do teste de sociabilidade. Entre as sessões de cada rato, a caixa foi limpa utilizando álcool 10% e papel toalha. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera e os vídeos foram organizados e analisados pelo software XploRat. Os dados brutos obtidos, referentes ao tempo passado pelos roedores em cada câmara da caixa e o tempo de aproximação de cada estímulo, foram submetidos a uma análise estatística pelo software Prism.

Após o experimento, os animais foram eutanasiados. Alguns deles passaram por perfusão transcardíaca, seguida pela retirada do cérebro para posterior análise. Tal procedimento de perfusão e eutanásia fez uso de injeção de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), por via intraperitoneal, e secção do diafragma.

Resultados e Discussões

No presente projeto de pesquisa, o comportamento social de 8 ratos controles e 3 ratos modelos de autismo tratados com antioxidante (VPAoxi) no período crítico do córtex auditivo primário foi analisados no teste de sociabilidade.

A análise estatística apontou uma diferença significativa entre o tempo de permanência por minuto dentro da câmara direita em comparação com as demais câmaras no grupo controle (Figura 1, $p< 0.05$). Os ratos do grupo controle passaram mais tempo na câmara direita, contendo o estímulo social (outro rato), do que na câmara esquerda (com gaiola e sem rato) e na câmara central vazia ($p< 0.05$). Se assemelhando ao comportamento do grupo controle, os ratos VPA tratados com antioxidante (VPAoxi) (Figura 1) também passaram mais tempo na câmara direita do que nas demais câmaras, embora sem diferença estatisticamente significativa.

Com relação ao tempo de aproximação (Figura 2), interação com os demais ratos, tanto o grupo controle como o grupo VPAoxi apresentaram maior tempo explorando o estímulo social (rato conhecido) na câmara direita em relação à câmara esquerda (com objeto e sem rato) e a câmara central vazia ($p< 0.05$).

De acordo com a literatura, roedores controle (sem tratamento) apresentam preferência sociável, permanecendo mais tempo em câmaras contendo coespecíficos do que naquelas com objetos (Rein et al., 2020; Jabarin et al., 2022; Wells et al., 2026). Em contrapartida, em modelos animais de autismo, esse padrão comportamental tende a se inverter, havendo uma preferência pela exploração de câmaras vazias ou contendo objetos inanimados (Rein et al., 2020; Jabarin et al., 2022; Wells et al., 2026).

Em nosso estudo, os ratos Wistar do modelo de autismo tratados demonstraram um padrão de exploração social semelhante ao do grupo controle. Esse resultado sugere um potencial efeito protetor/resgate do antioxidante administrado durante o desenvolvimento do córtex auditivo primário sobre o comportamento social nesses animais. No entanto, para ratificar se esse benefício é atribuível especificamente ao composto antioxidante, nitidamente faz-se necessário expandir o tamanho amostral do grupo VPA tratado com antioxidante e incluir no delineamento os grupos experimentais VPA sem tratamento e VPA tratado apenas com exossomos (sem o ativo antioxidante).

Conclusão

A partir dos resultados parciais desta pesquisa, ficou demonstrado que os roedores do modelo de autismo expostos ao tratamento com antioxidante durante o período crítico de desenvolvimento do córtex auditivo primário apresentam um perfil comportamental social semelhante ao do grupo controle. Apesar de o estágio atual da nossa pesquisa não permitir a confirmação definitiva desses achados — dada a necessidade de ampliação amostral e inclusão dos grupos de controle do veículo — os dados preliminares apontam para um promissor efeito terapêutico da intervenção antioxidante no resgate de déficits sociais associados ao autismo.

Referências

ANOMAL, R. F.; DE VILLERS-SIDANI, E.; MERZENICH, M. M.; PANIZZUTTI, R. Manipulation of BDNF signaling during critical period affect the tonotopic organization and receptive fields of the primary auditory cortex after pure tone exposition. PLOS ONE, v. 8, n. 5, e64208, 2013.

BAIRD, G.; CASS, H.; SLONIMS, V. Diagnosis of autism. BMJ, v. 327, n. 7413, p. 488–493, 30 ago. 2003.

BEGUM, M. R.; SNG, J. C. G. Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. Journal of Neurochemistry, v. 142, n. 5, p. 649–661, 2017.

BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; MAFFEI, L. Critical periods during sensory development. Current Opinion in Neurobiology, v. 10, p. 138–145, 2000.

BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; RATTO, G. M.; MAFFEI, L. Molecular basis of plasticity in visual cortex. Trends in Neurosciences, v. 26, p. 369–378, 2003.

CHENG, S. B.; LIU, H. T.; CHEN, S. Y.; LIN, P. T.; LAI, C. Y.; HUANG, Y. C. Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme

activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. PLOS ONE, v. 12, n. 1, e0170016, 2017.

CHOI, H.; KIM, M. Y.; KIM, D. H.; YUN, H.; OH, B. K.; KIM, S. B.; SONG, I. H.; PARK, H. S.; KIM, S. E.; PARK, C.; et al. Quantitative biodistribution and pharmacokinetics study of GMP-grade exosomes labeled with 89Zr radioisotope in mice and rats. Pharmaceutics, v. 14, n. 6, 1118, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061118.

CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. Brain Pathology, v. 17, n. 4, p. 448–459, 2007.

JABARIN, R.; NETSER, S.; WAGNER, S. Beyond the three-chamber test: toward a multimodal and objective assessment of social behavior in rodents. Molecular Autism, v. 13, art. 45, 2022. DOI: 10.1186/s13229-022-00521-6. Acesso em: 30 ago. 2026.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. The Nervous Child, New York, v. 2, p. 217–250, 1943.

KATAOKA, S.; TAKUMA, K.; KINOSHITA, C.; KAKIMOTO, K.; KIM, H.-J.; KOBAYASHI, M.; et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 16, n. 1, p. 91–103, 2013.

LARNER, O.; ROBERTS, J.; TWISS, J.; FREEMAN, L. A need for consistency in behavioral phenotyping for ASD: analysis of the valproic acid model. Autism Research and Treatment, v. 2021, art. 8863256, 2021. DOI: 10.1155/2021/8863256.

REIN, B.; MA, K.; YAN, Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. Nature Protocols, v. 15, n. 10, p. 3464–3477, 2020. DOI: 10.1038/s41596-020-0382-9. Acesso em: 30 ago. 2026.

ROBERTSON, C. E.; BARON-COHEN, S. Sensory perception in autism. Nature Reviews Neuroscience, v. 18, n. 11, p. 671–684, 2017.

RODIER, P. M.; INGRAM, J. L.; TISDALE, B.; NELSON, S.; ROMANO, J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. The Journal of Comparative Neurology, v. 370, n. 2, p. 247–261, 24 jun. 1996.

ROSENHALL, U.; NORDIN, V.; SANDSTROM, M.; AHLSEN, G.; GILLBERG, C. Autism and hearing loss. Journal of Autism and Developmental Disorders, v. 29, p. 349–357, 1999.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. Neuropsychopharmacology, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

WELLS, C.; HUDDLESTON, K. P.; BROWN, S.; RAZZAQ, F.; CHICK, D.; ROGERS, T. D. Novel behavioral tasks for the measurement of social motivation in

mice: a comparison across strains. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 19, art. 1678147, 2026. DOI: 10.3389/fnbeh.2025.1678147. Acesso em: 30 ago. 2026.

ZHOU, X.; PANIZZUTTI, R.; DE VILLERS-SIDANI, E.; MADEIRA, C.; MERZENICH, M. M. Natural restoration of critical period plasticity in the juvenile and adult primary auditory cortex. The Journal of Neuroscience, v. 31, n. 15, p. 5625–5634, 2011.

Anomal RF, de Villers-Sidani E, Merzenich MM, Panizzutti R (2013) Manipulation of BDNF signaling during critical period affect the tonotopic organization and receptive fields of the primary auditory cortex after pure tone exposition. PlosOne 8(5): e64208.

BAIRD, Gillian; CASS, Hilary; SLONIMS, Vicky. Diagnosis of autism. BMJ, v. 327, n. 7413, p. 488–493, 30 ago. 2003.

Begum MR, Sng JCG (2017) Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. J Neurochem 142(5):649-661.

Berardi N, Pizzoruso T, Maffei L (2000) Critical periods during sensory development. Curr Opin Neurobiol 10:138-145.

Berardi N, Pizzoruso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in visual cortex. Trends Neurosci 26: 369-378.

Cheng SB, Liu HT, Chen SY, Lin PT, Lai CY, Huang YC (2017) Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection. PLoS One 12(1):e0170016.

Choi H, Kim MY, Kim DH, Yun H, Oh BK, Kim SB, Song IH, Park HS, Kim SE, Park C, Choi C. Quantitative Biodistribution and Pharmacokinetics Study of GMP-Grade Exosomes Labeled with 89Zr Radioisotope in Mice and Rats. Pharmaceutics. 2022 May 24;14(6):1118. doi: 10.3390/pharmaceutics14061118.

CRAWLEY, Jacqueline N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. Brain Pathology, v. 17, n. 4, p. 448–459, 2007.

JABARIN, Renad; NETSER, Shai; WAGNER, Shlomo. Beyond the three-chamber test: toward a multimodal and objective assessment of social behavior in rodents. Molecular Autism, v. 13, artigo 45, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13229-022-00521-6. Acesso em: 30 ago. 2026.

KANNER, Leo. Autistic disturbances of affective contact. The Nervous Child, New York, v. 2, p. 217–250, 1943.

KATAOKA, Satoshi; TAKUMA, Kazuhiro; KINOSHITA, Chie; KAKIMOTO, Kazuki; KIM, Hyun-Joo; KOBAYASHI, Masahiko; et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. International Journal of Neuropsychopharmacology, v. 16, n. 1, p. 91–103, 2013.

LARNER, Olivia; ROBERTS, Jane; TWISS, Jeffery; FREEMAN, Linnea. A need for consistency in behavioral phenotyping for ASD: analysis of the valproic acid model. Autism Research and Treatment, v. 2021, artigo 8863256, 2021. DOI: 10.1155/2021/8863256.

REIN, Benjamin; MA, Kaijie; YAN, Zhen. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. Nature Protocols, v. 15, n. 10, p. 3464-3477, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41596-020-0382-9. Acesso em: 30 ago. 2026.

Robertson CE, Baron-Cohen S (2017) Sensory perception in autism. Nat Rev Neurosci 18(11):671-684

RODIER, Patricia M.; INGRAM, Jennifer L.; TISDALE, Barbara; NELSON, Sarah; ROMANO, John. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. Journal of Comparative Neurology, v. 370, n. 2, p. 247–261, 24 jun. 1996.

Rosenhall U, Nordin V, Sandstrom M, Ahlsen G, Gillberg C (1999) Autism and hearing loss. J Autism Dev Disord 29:349–357.

SCHNEIDER, Tomasz; PRZEWŁOCKI, Ryszard. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. Neuropsychopharmacology, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

WELLS, Caitlyn; HUDDLESTON, Kendall P.; BROWN, Steven; RAZZAQ, Fatima; CHICK, Donald; ROGERS, Tiffany D. Novel behavioral tasks for the measurement of social motivation in mice: a comparison across strains. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 19, artigo 1678147, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fnbeh.2025.1678147. Acesso em: 30 ago. 2026.

Zhou X, Panizzutt Ri, de Villers-Sidani E, Madeira C, Merzenich MM (2011) Natural Restoration of Critical Period Plasticity in the Juvenile and Adult Primary Auditory Cortex. J Neurosci 31(15):5625-34.

CÓDIGO: SB0752

AUTOR: ANA CLARA PEGADO FERREIRA DA SILVA

ORIENTADOR: MELQUISEDEC ABIARE DANTAS DE SANTANA

TÍTULO: ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DA MUSCULATURA EXTRÍNSECA DA LÍNGUA EM TAMANDUÁS-MIRINS.

Resumo

A musculatura relacionada à língua do Tamanduá-mirim (Tamandua tetradactyla) é altamente especializada para a mirmecofagia, sendo um mecanismo essencial para a sobrevivência desses animais, permitindo-lhes acessar de forma eficiente insetos sociais que constituem a maior parte de sua dieta. O Tamanduá-mirim utiliza sua língua fina, comprida e viscosa para alcançar desde a parte mais superficial até a parte mais interna dos cupinzeiros e formigueiros, garantindo a captura do alimento em locais de difícil acesso. A língua pode medir de 20-40 centímetros de comprimento a depender da espécie de tamanduá, passando por uma abertura diminuta envolvida por pequenos lábios. Além disso, os animais apresentam cabeça tubular e delgada, focinho alongado e garras fusionadas, adaptações essenciais que permitem quebrar e adentrar nas colônias de cupins e formigas, possibilitando que a língua explore completamente o interior das colônias. Então, esse projeto objetiva estudar os músculos extrínsecos da língua do Tamanduá, analisando a sua morfofuncionalidade, incluindo os músculos associados ao aparelho hióide, bem como os mecanismos de extensão e retração da língua durante a alimentação. As análises serão realizadas por meio de dissecações anatômicas detalhadas e registros fotográficos, utilizando cinco (5) espécimes de Tamanduá-mirim que serão conservados com a técnica de fixação com formol.

Palavras-chave: Anatomia Animal, Esternoglosso, Dissecação, Tamanduá-mirim.

TITLE: Morphofunctional analysis of the extrinsic musculature of the tongue in lesser anteaters (Tamandua tetradactyla, Linnaeus, 1758).

Abstract

The musculature related to the tongue of the Southern Tamandua (Tamandua tetradactyla) is highly specialized for myrmecophagy, an essential mechanism for the survival of these animals, allowing them to efficiently access social insects that constitute the majority of their diet. The Southern Tamandua uses its thin, long, and sticky tongue to reach from the most superficial to the most internal parts of termite mounds and ant nests, ensuring the capture of food in hard-to-reach places. The tongue

can measure 20-40 centimeters in length depending on the anteater species, passing through a tiny opening surrounded by small lips. Furthermore, the animals have a tubular and slender head, an elongated snout, and fused claws—essential adaptations that allow them to break open and enter termite and ant colonies, enabling the tongue to fully explore the interior of the colonies. Therefore, this project aims to study the extrinsic muscles of the Tamandua's tongue, analyzing its morphofunctionality, including the muscles associated with the hyoid apparatus, as well as the mechanisms of tongue extension and retraction during feeding. The analyses will be carried out through detailed anatomical dissections and photographic records, using five (5) specimens of Tamandua-mirim that will be preserved using the formalin fixation technique.

Keywords: Animal Anatomy, Sternoglossus, Dissection.

Introdução

O Tamandua-tetradactyla (Linnaeus, 1758), popularmente conhecido como Tamanduá-mirim ou Tamanduá-de-colete, é uma das espécies de mamíferos xenartro da família Myrmecophagidae que inclui o gênero tamandua, sendo uma das quatro espécies de tamanduás que junto com as preguiças está incluído na ordem Pilosa. Os hábitos dos Tamanduás-mirins são em sua maioria noturnos e arborícolas, mas podendo ser encontrado em períodos crepusculares durante o forrageamento, e são solitários quando adultos (Scholz, 1930; Nowak, 1999; Macdonal, 2006). As maiores causas das mortes desses animais são as perdas de habitat, caça, atropelamentos em rodovias que cruzam seu habitat natural (Miranda, 2012) e as queimadas que afetam a sua área de forrageamento, o que acaba impactando diretamente o seu hábito alimentar (Biondo et al., 2019).

A sua dieta é composta essencialmente por insetos, sendo os cupins e as formigas os principais deles. Os Tamanduás-mirins localizam seu alimento principalmente pelo olfato e realizam buscas continuamente por oito a dez horas a cada dia (Lubin; Montgomery, 1981). Por suas presas serem coloniais, se concentram em um único local - ninho ou colônia - que se torna uma abundante fonte nutritiva (Lubin et al., 1977; Redford, 1986). Porém, apesar de ser uma espécie frequente em todos os biomas do Brasil (Desbiez; Medri, 2010), pouco se conhece sobre seus hábitos alimentares. A sua musculatura adaptada à projeção da sua língua extremamente longa destacam-se como exemplos de adaptações morfológicas e funcionais moldadas por pressões seletivas ao longo da evolução (Napier, 1954). Essas características são cruciais para sua alimentação e sobrevivência em variados habitats.

Entre outras adaptações, essa espécie não possui dentes e é adaptada para uma dieta extremamente especializada, característica da família de Mirmecofagídeos. Esses animais apresentam uma cabeça tubular e delgada, com focinho alongado, a boca é formada por uma abertura diminuta, envolvida por pequenos lábios, o sentido olfativo é extremamente acurado, a pele é espessa e resistente (Wetzel, 1985; Naples, 2004.), uma língua fina, longa e recoberta por uma saliva viscosa, que facilita a captura dos insetos. Além disso, utilizam suas garras fortes para romper formigueiros e cupinzeiros, acessando suas presas de forma eficiente (NOWAK; Paradiso, 1983; Macdonald, 2006; Hayssen, 2011). Essas adaptações permitem que a espécie explore um nicho alimentar restrito, exercendo papel importante no ecossistema. Em seu habitat natural, o Tamanduá-de-colete exerce um trabalho fundamental para o controle populacional dos insetos que compõem a sua dieta, eles representam um papel importante no fluxo de

energia e de biomassa dos ecossistemas (Hölldobler, 2019).
Apesar de sua relevância ecológica na cadeia trófica, ainda há lacunas consideráveis no conhecimento sobre as estruturas anatômicas envolvidas na projeção da língua e nas suas funções associadas. Estudos detalhados sobre essas adaptações são essenciais para compreender esse complexo mecanismo, determinante para as estratégias alimentares da espécie, bem como para identificar como essas características se comparam a outras espécies com especializações semelhantes.

Metodologia

1. Coleta e preparação dos espécimes
Foram utilizados quatro (4) cadáveres de Tamandua tetradactyla, provenientes dos seguintes acervos: Laboratório de Anatomia Animal da UFRN (3 espécimes) dois espécimes filhotes conservados pelo método de congelamento (fresh frozen cadaver) e um (1) espécimes adulto conservados pelo método de fixação em formol. E também do Museu de Ciências Morfológicas da UFRN (1 espécime), conservado em formol, respeitando-se as normas éticas e legais vigentes.
Os indivíduos que foram preparados para dissecação por meio de técnicas de fixação em formol, passaram por uma conservação adequada para manutenção da integridade dos tecidos e órgãos. Os animais foram fixados com solução de formol diluído a 10%, utilizando-se agulhas hipodérmicas 25 × 6 mm para a injeção da substância, garantindo a adequada penetração do fixador nos tecidos. Já os animais que foram conservados pelo método fresh frozen cadaver, foram dissecados ao total 5 vezes para preservar a integridade dos tecidos dos animais evitando o apodrecimento.
2. Dissecação e descrição anatômica
As dissecações foram realizadas nas regiões cervical, supra-hioidea e infra-hioidea, seguindo plano de dissecação previamente estabelecido com foco nos músculos extrínsecos da língua.
Foram realizadas descrições detalhadas da morfologia muscular, contemplando direção das fibras, origem e inserção da musculatura, trajeto dos músculos, presença de ramificações (quando existentes), retináculos e comprimento muscular. As medidas foram obtidas por meio de fita métrica e régua milimetradas, além de paquímetro digital.
Equipamentos de Proteção Individual (EPI)
Foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI), incluindo luvas e máscaras cirúrgicas, jaleco de mangas longas, calça comprida e sapatos fechados.
Materiais e instrumentos utilizados
Bancadas de dissecação;
Cabos de bisturi nº 3 e nº 4 com lâminas descartáveis nº 15 e nº 24;
Tesouras cirúrgicas retas e curvas de 14 cm;
Pinças Crile e pinças cirúrgicas com e sem dente, ambas de 16 cm;
Solução conservante (formol a 10%) para manutenção dos espécimes.
Procedimento de dissecação
Foi realizada, com bisturi, uma incisão mediana na região ventral, estendendo-se da incisura mandibular até a região abdominal cranial (região epigástrica). Em seguida, procedeu-se ao rebatimento do tecido epitelial com auxílio de pinças e tesouras,

possibilitando a identificação gradual das estruturas anatômicas, com ênfase nos músculos extrínsecos da língua.
Foram removidos os tecidos fasciais e adiposos que dificultavam a completa visualização da musculatura de interesse. Cada músculo foi isolado e descrito quanto à origem, inserção e direção das fibras, permitindo a análise de sua morfofuncionalidade e de sua participação nos movimentos de projeção e retração da língua.

4. Aspectos éticos
O projeto observou todas as normas de ética no uso de animais em pesquisa, tendo sido utilizadas exclusivamente carcaças de espécimes de Tamandua tetradactyla preservadas em coleções científicas, sem captura ou manipulação de animais vivos.
Este estudo foi analisado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo classificado como isento de apreciação ética, por tratar-se de pesquisa realizada exclusivamente com espécimes cadáveres, conforme protocolo nº 001/2026.

Resultados e Discussões

As dissecações realizadas até o momento permitiram identificar estruturas musculares e glandulares associadas às regiões supra-hioidea e infra-hioidea de Tamandua tetradactyla. No espécime juvenil, foram observadas pequenas glândulas salivares, com aproximadamente 3 mm, distribuídas da região mandibular à torácica, formando um arranjo semelhante a um “colar de glândulas”. Foram identificados os músculos milo-hióideo, gênio-hióideo, genioglosso, hioglosso, estilo-hióideo e esternoglosso, apresentando diferentes relações anatômicas com a língua e o aparelho hioide.

No espécime adulto, observou-se uma estrutura glandular de maior dimensão e concentração na região cervicotorácica, com aproximadamente 10 cm de comprimento e 8 cm de largura. Também foram identificados os músculos milo-hióideo, genioglosso e esternoglosso, mantendo, de modo geral, a organização anatômica observada no juvenil. O milo-hióideo apresentou 13 cm no adulto, enquanto o genioglosso e o esternoglosso apresentaram aproximadamente 10 cm e 15 cm, respectivamente.

De forma preliminar, não foram observadas diferenças anatômicas significativas na organização dos músculos analisados entre os espécimes, sendo as principais diferenças relacionadas às dimensões das estruturas e à distribuição das glândulas salivares. Esses resultados iniciais sugerem uma organização morfofuncional integrada das estruturas associadas à língua, cuja análise será ampliada com a continuidade das dissecações e avaliação de novos espécimes

Conclusão

Os resultados preliminares indicam uma organização anatômica integrada da musculatura associada à língua e ao aparelho hioide em Tamandua tetradactyla. Foram identificadas estruturas musculares e glandulares relacionadas às regiões supra-hioidea e infra-hioidea, com diferenças principalmente nas dimensões e na distribuição das glândulas salivares entre os espécimes analisados. A continuidade das dissecações e a análise de novos espécimes serão necessárias para confirmar os padrões observados e ampliar a compreensão das adaptações morfofuncionais relacionadas à projeção da língua na espécie.

Referências

BIONDO, Diezza; PLETSCH, Juliana Aquino; GUZZO, Guilherme Brambatti. Impactos da ação antrópica em indivíduos da fauna silvestre de Caxias do Sul e região: uma abordagem ex situ. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 17, n. 1, 15 abr. 2019.

DESBIEZ, A. L. J.; MEDRI, I. M. Density and habitat use by giant anteaters (Myrmecophaga tridactyla) and southern tamanduas (Tamandua tetradactyla) in the Pantanal wetland, Brazil. Edentata, v. 11, n. 1, p. 4–10, 2010.

HAYSSEN, V. Tamandua tetradactyla (Pilosa: Myrmecophagidae). Mammalian Species, v. 43, n. 1, p. 64–74, 2011.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. The ants. 1. ed. Massachusetts: Harvard University Press, 1990.

LUBIN, Y. D.; MONTGOMERY, G. G.; YOUNG, O. P. Food resources of anteaters (Edentata: Myrmecophagidae) I. A year's census of arboreal nests of ants and termites on Barro Colorado Island, Panama Canal Zone. Biotropica, v. 9, n. 1, p. 26–34, 1977.

MACDONALD, R. The Encyclopedia of Mammals. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.

MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. M.; RODRIGUES, F. H. G. Ordem Pilosa. In: REIS, N. R.; PERACHII, A. L.; PEDRO, W. A.; et al. (Org.). Mamíferos do Brasil. 2. ed. Londrina: Nélio R. dos Reis, 2011, p. 91–106.

MIRANDA, F. Manutenção de tamanduás em cativeiro. São Carlos: Editora Cubo, 2012.

MIRANDA, F.; BERTASSONI, A.; ABBA, A. M. Myrmecophaga tridactyla. The IUCN Red List of Threatened Species 2014. Disponível em: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T14224A47441961.en. Acesso em: 19 nov. 2025.

NAPIER, J. R. The feeding mechanism of anteaters. Journal of Zoology, v. 123, n. 4, p. 465–486, 1954.

NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the World, Volume 1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1999. p. 155–156.

NOWAK, R. M.; PARADISO, J. L. Walker's mammals of the world. 4. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1983. 1362 p.

REISS, K. Z. Using phylogenies to study convergence: The case of the ant-eating mammals. American Zoologist, v. 41, n. 3, p. 507–525, 2001.

SANTOS, Sarah Almeida; RIBEIRO ARAGÃO, Érika Carla; PATHEK, Dinah Bárbara. Impacto das queimadas em Roraima: relato de caso de tamanduá-mirim (Tamandua tetradactyla) com queimaduras de segundo grau. Revista Multidisciplinar Pey Këyo Científico, v. 11, n. 1, 11 abr. 2025. Disponível em: https://estacio.periodicoscientificos.com.br/index.php/pkcroraima/article/view/3774. Acesso em: .15 nov. 2025.

SILVA, Andrezza Braga Soares; CAVALCANTE, Maria Michele Araujo de Sousa; RIZZO, Marcia dos Santos; GUERRA, Sergio Paulo Lima; PEREIRA, Ryna Delly Gomes; LEITE, Carla Maria de Carvalho; CONDE JÚNIOR, Airton Mendes. Anatomia funcional do músculo esternoglosso do Tamandua tetradactyla (Linnaeus, 1758). Archives of Veterinary Science, Curitiba, v. 21, n. 3, p. 55–60, 2016.

SILVA, F. R. da; GOMES, L. F. de S.; SILVA, J. R. da. Tamanduás (Vermilingua, Pilosa) da Bacia do Alto Paraguai: uma revisão do conhecimento do planalto à planície pantaneira. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais, Belém, v. 17, n. 2, p. 833–855, jul./dez. 2022.

SILVA, M. M. Análise da dieta de Tamandua tetradactyla Linnaeus, 1758 (Pilosa: Myrmecophagidae) do Rio de Janeiro e Minas Gerais, Brasil. 2019. 46 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.

WETZEL, R. M. Systematics, distribution, ecology, and conservation of South American edentates. In: Mares, M. A.; Genoways, H. H. (Eds.). Mammalian Biology in South America. Pittsburgh: Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, 1982. p. 345–375.

CÓDIGO: SB0755

AUTOR: FELIPE FERNANDO SOBREIRO DA SILVA

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Segurança Biológica de Microesferas de Hidroxiapatita Carbonatada: Avaliação Citotóxica e Genotóxica para Aplicações em Regeneração Óssea

Resumo

O tecido ósseo apresenta capacidade natural de regeneração e remodelação contínua; entretanto, danos extensos podem exceder essa capacidade de reparo, tornando necessárias intervenções para a recuperação da estrutura e da massa óssea. Embora os enxertos ósseos autólogos sejam considerados o padrão-ouro no tratamento de defeitos ósseos, sua utilização apresenta limitações, reforçando a necessidade de alternativas na engenharia tecidual e medicina regenerativa. Nesse contexto, a hidroxiapatita (HA) destaca-se como um biomaterial amplamente empregado, cujas propriedades biológicas podem ser aprimoradas pela incorporação de íons como estrôncio, zinco e carbonato. Neste estudo, foi investigado o potencial citotóxico e genotóxico de microesferas de HA nanoestruturada modificadas com diferentes íons, por meio dos ensaios in vitro de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN), respectivamente. Os eluatos foram preparados conforme normas internacionais e avaliados em células de ovário de hamster chinês, sublinhagem K1 (CHO-K1). Os resultados demonstraram efeito citotóxico apenas na maior concentração avaliada (100 mg/mL), enquanto, a 50 mg/mL, todas as amostras apresentaram viabilidade celular comparável ao controle negativo. Os resultados do CBMN não evidenciaram efeitos genotóxicos associados às amostras avaliadas.

Palavras-chave: Biomateriais .Nanomateriais. Biocompatibilidade. Regeneração.

TITLE: Biological Safety of Carbonated Hydroxyapatite Microspheres: Cytotoxic and Genotoxic Evaluation for Applications in Bone Regeneration

Abstract

Bone tissue has a natural capacity for continuous regeneration and remodeling; however, extensive damage may exceed its repair capacity, making interventions necessary to restore bone structure and mass. Although autologous bone grafts are considered the gold standard for treating bone defects, their use presents limitations, reinforcing the need for alternative approaches in tissue engineering and regenerative medicine. In this context, hydroxyapatite (HA) stands out as a widely used biomaterial

whose biological properties can be enhanced through the incorporation of ions such as strontium, zinc, and carbonate. This study investigated the cytotoxic and genotoxic potential of nanostructured HA microspheres modified with different ions using the in vitro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assays, respectively. Sample eluates were prepared according to international standards and evaluated in Chinese hamster ovary K1 (CHO-K1) cells. The results demonstrated cytotoxic effects only at the highest concentration evaluated (100 mg/mL), whereas at 50 mg/mL, all samples showed cell viability comparable to that of the negative control. Furthermore, the CBMN results showed no genotoxic effects associated with the evaluated samples, indicating the absence of significant nuclear alterations under the experimental conditions used.

Keywords: Biomaterials. Nanomaterials. Biocompatibility. Regeneration.

Introdução

O tecido ósseo apresenta capacidade de autorregeneração, passando por remodelação contínua decorrente do equilíbrio entre reabsorção e formação óssea (CIOSEK et al., 2021). Entretanto, situações severas de perda de massa óssea, deformidades, alterações no desenvolvimento ou complicações cirúrgicas podem comprometer essa capacidade, tornando necessária a intervenção para restaurar a massa óssea perdida (BELOTI et al., 2024). Os enxertos ósseos autólogos são considerados a principal referência para a reconstrução de defeitos ósseos; entretanto, sua utilização é limitada pela reduzida disponibilidade de material e possibilidade de complicações pós-operatórias (MIRON et al., 2024). Diante dessas limitações, a medicina regenerativa tem buscado alternativas, com destaque para biomateriais capazes de mimetizar os compostos orgânicos e inorgânicos da matriz óssea (VIMALRAJ et al., 2023).

Entre eles, os biomateriais nanoestruturados têm se destacado por apresentarem biocompatibilidade e exercerem adequadamente as funções biológicas para as quais foram desenvolvidos (ELAKKIYA et al., 2023). Esses nanomateriais podem ser obtidos por processos químicos, físicos e biológicos e apresentados em diferentes formas, como microesferas (SALEM et al., 2024). Entre os mais empregados na regeneração óssea destaca-se a hidroxiapatita (HA), reconhecida por sua biocompatibilidade e potencial osteocondutor (FARAZIN et al., 2024).

A HA pode ser associada a diferentes elementos para aprimorar suas propriedades e potencializar suas atividades biológicas (GEORGE, S. M. et al., 2022). Os íons de estrôncio (Sr^{2+}) estão associados à promoção da formação óssea e redução de processos inflamatórios. Estruturas porosas de fosfatos de cálcio amorfos (CaP) contendo Sr^{2+} mostraram potencial para estimular a formação de novo tecido ósseo, despertando interesse no desenvolvimento de HA substituída por esse íon (CODREA et al., 2024). Os íons de zinco (Zn^{2+}) podem estimular a proliferação, a adesão e a diferenciação osteogênica (DORNELAS et al., 2024). A temperatura de síntese também pode influenciar a estrutura da HA nanoestruturada: temperaturas elevadas aumentam a cristalização e o tamanho do cristalito, enquanto temperaturas próximas a 5 °C resultam em nanopartículas irregulares e menos tóxicas (AL ROSA et al., 2022). A substituição por íons carbonato (CO_3^{2-}) pode aumentar a solubilidade da HA, favorecendo sua reabsorção por osteoclastos (CAO et al., 2021). Contudo, mudanças químicas ou

estruturais podem alterar a interação do material com o ambiente biológico, tornando fundamental investigar seu comportamento nos sistemas biológicos (DORNELAS et al., 2024).

Conforme a norma ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade in vitro deve ser o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de materiais biomédicos (ISO 10993-5:2009). Como nanomateriais podem agir diferentemente no organismo, também é necessária a avaliação da genotoxicidade, pois podem causar danos ao DNA, induzindo mutações ou alterações estruturais no material genético (ALMEIDA et al., 2020; DE BRITO et al., 2021). Entre os testes de citotoxicidade, a redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um dos mais utilizados, sendo um ensaio colorimétrico que mede a atividade metabólica celular pela redução do MTT a formazan, indicador de viabilidade, proliferação e citotoxicidade (GHASEMI et al., 2021).

Para avaliar a genotoxicidade, o ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) é amplamente usado para detectar danos no DNA, quantificando micronúcleos, brotos e pontes nucleoplasmáticas em células binucleadas obtidas com citocalasina B, que bloqueia a citocinese sem interferir na mitose (FARABAUGH et al., 2023).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de microesferas baseadas em HA nanoestruturada contendo estrôncio, zinco e íons carbonato, por meio dos ensaios in vitro MTT e CBMN, respectivamente.

Metodologia

Preparo das Amostras: A preparação dos eluatos seguiu os protocolos estabelecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2016) e pela norma ISO 10993-5. Eluatos aquosos foram obtidos a partir das microesferas de HA nanoestruturada, que foram sintetizadas a 5 °C e que contêm carbonato (CHA, pH 12), ou zinco (ZnHA, pH 12), ou estrôncio (SrHA). Hidroxiapatita nanoestruturada sem substituições iônicas (HA, pH 9) e microesferas de nanohidroxiapatita produzidas a 90 °C (um grupo designado branco B90°, HA, pH 12) também foram usadas para preparar eluatos utilizando como solvente o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sem adição de soro fetal bovino (FBS). Cada amostra foi preparada na proporção de 100 mg de material para 10 mL de meio. As amostras foram incubadas a 37 °C por 24 horas, em tubos Falcon de 15 mL. Posteriormente, foram centrifugadas, e os sobrenadantes foram coletados e aliquotados. O FBS foi adicionado a cada eluato para uma concentração final de 10%.

Cultivo Celular: A linhagem CHO-K1 (ovário de hamster chinês) foi utilizada nos ensaios. Estas células são recomendadas pela OECD para o ensaio de micronúcleo (CBMN) in vitro com finalidade de avaliação genotóxica. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), sob atmosfera com 5% de CO_2 a 37 °C.

Teste de Citotoxicidade (Ensaio de MTT): As células CHO-K1 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5 x 10^3 células/poço, utilizando 100 µL do meio DMEM suplementado, e incubadas por 24 h a 37 °C com 5% de CO_2. Em seguida, o meio foi descartado e substituído por 100 µL dos eluatos das amostras. Nos poços de controle negativo, as células permaneceram apenas com o meio basal. Após mais 24 horas de incubação, o meio foi removido e foram adicionados 100 µL da solução de MTT a 1 mg/mL, com nova incubação por 4 horas. Os cristais de formazan formados foram solubilizados com DMSO e a leitura foi realizada a 570 nm em leitor de microplacas. A viabilidade celular foi expressa em percentual, comparando-se os grupos tratados ao controle negativo.

Avaliação da genotoxicidade pelo Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese - CBMN: A metodologia baseou-se no protocolo descrito por Fenech (2007). As células foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 2 x 10^4 células/poço em 500 µL de meio completo, incubadas por 24 horas. Após esse período, os meios foram substituídos por 500 µL dos eluatos. Os controles foram tratados com meio sem adição de amostra. Passadas 24 horas, os meios foram removidos e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente, adicionou-se meio contendo citocalasina B (5 µg/mL) para bloquear a citocinese. No controle positivo, também foi adicionada mitomicina C (1 µg/mL) às células. Após mais 24 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS, tratadas com tripsina 0,025% por 5 min e ressuspensas em meio basal. A suspensão foi centrifugada (1200 rpm por 8 min) e os pellets celulares foram fixados com solução gelada de ácido acético/metanol (1:9), em três etapas sucessivas. Ao final, os pellets foram ressuspensos em 400 µL da solução fixadora. Foram gotejadas 60 µL da suspensão celular em lâminas que estavam suspensas no banho-maria a 60 °C. As lâminas então foram deixadas para secar ao ar e coradas com Giemsa 5%, por 5 minutos. A análise foi realizada às cegas ao microscópio óptico (400x); contabilizaram-se as primeiras 500 células para cálculo do Índice de Divisão Nuclear (NDI) e 3000 células binucleadas para identificação de alterações nucleares como micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPB) e brotos nucleares (NBUD). Os dados foram expressos como número de alterações por 1000 células binucleadas, conforme Fenech (2011).

Análise Estatística: Os experimentos do ensaio de citotoxicidade foram repetidos em três ensaios independentes, cada um em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA do tipo one-way, seguida do teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

O efeito das amostras na viabilidade das células expostas, por 24 horas, a 50 e a 100 mg/mL, determinado pelo ensaio de MTT, é apresentado nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Na concentração de 50 mg/mL, as reduções na viabilidade celular foram consideravelmente menores: 8,34 % (branco), 1,34 % (HA), 14 % (ZnHA) e 1,34 % (SrHA). Por outro lado, na concentração de 100 mg/mL, observou-se uma redução na

metabolização do MTT de 44 % no branco, 45,67 % na HA, 53 % na CHA, 45,67 % na ZnHA e 52 % na SrHA. De acordo com a norma ISO 10993-5 (2009), considera-se que um material apresenta potencial citotóxico quando a viabilidade celular é inferior a 70 %. Assim, os resultados demonstram que, nas condições testadas, as amostras na concentração de 50 mg/mL não apresentaram perfil citotóxico. No entanto, na concentração de 100 mg/mL observou-se citotoxicidade. Esse perfil citotóxico de amostras de HA em concentrações mais altas já foi relatado na literatura. Em Sonmez et al. (2016), a exposição a nanopartículas de hidroxiapatita resultou em redução significativa da viabilidade celular, medida pelo ensaio MTT, sendo a concentração mais alta utilizada de 1 mg/mL. De forma semelhante, WANG et al. (2012) observaram inibição do crescimento celular e indução de apoptose em concentrações de até 10 mg/mL. Esses dados indicam que a citotoxicidade observada neste estudo pode ser atribuída à alta concentração de 100 mg/mL, considerada excessiva para sistemas biológicos invitro, sendo inclusive superior àquela utilizada em outros trabalhos nos quais efeitos tóxicos já foram detectados.

No ensaio de CBMN, as células CHO-K1 foram tratadas com eluatos obtidos a partir da proporção de 50 mg de material por mL de meio. Após o tratamento, foram avaliadas possíveis alterações nucleares, como a formação de micronúcleos (MN), brotos nucleares (NBUD) e pontes nucleoplasmáticas (NPB). , em células binucleadas. Os resultados do único ensaio realizado encontram-se apresentados na Tabela 1, expressos como número de alterações por 1000 células binucleadas, em comparação com o controle negativo. Também foi calculado o índice de divisão nuclear (NDI) para cada grupo avaliado.

Como o experimento foi conduzido com apenas uma réplica biológica, não foi possível realizar uma análise estatística robusta que indicasse diferenças significativas entre os tratamentos. Os resultados preliminares indicam que, enquanto alguns tratamentos apresentaram frequências de alterações nucleares próximas ao controle negativo, a amostra de CHA promoveu um aumento nas alterações nucleares. Dessa forma, não é possível concluir quanto à ausência de genotoxicidade para este material. São necessários novos ensaios, com número adequado de réplicas biológicas, para confirmar a genotoxicidade destes eluatos. Esse achado para a CHA não corrobora os estudos recentes da literatura. ESEN, Merve et al. (2024), KAVASI et al. (2021) avaliaram nanopartículas de HA em ensaio de micronúcleo, seguindo as diretrizes da ISO 10993-5 e da OECD 487, e não observaram aumento significativo na frequência de micronúcleos em comparação ao controle negativo, indicando ausência de genotoxicidade. Em uma revisão sistemática, que investigou o potencial de genotoxicidade de compostos nanoestruturados de HA de artigos publicados entre 2000 e 2022 (DE SOUZA et al., 2024), apenas 15 artigos relataram potencial genotóxico, indicando que, em geral, a HA tem um perfil seguro de genotoxicidade. Assim, os resultados preliminares obtidos neste trabalho seguem o mesmo padrão descrito na literatura recente para os materiais à base de HA contendo zinco e estrôncio, mas o mesmo não parece acontecer para a HA contendo carbonato, indicando que estudos adicionais com replicações e análises estatísticas mais robustas ainda são necessários para confirmar os resultados. No entanto, os resultados iniciais são promissores quanto à biossegurança desses materiais. Contudo, a continuidade do presente estudo tornou-se inviável devido à indisponibilidade das amostras necessárias para a realização das etapas experimentais subsequentes, em razão da descontinuação de sua produção. Consequentemente, a quantidade insuficiente de material impossibilitou a execução das atividades previstas

no plano de trabalho, limitando o prosseguimento da investigação e a obtenção de dados adicionais necessários ao aprofundamento e à confirmação dos resultados preliminares.

Conclusão

Este estudo avaliou a citotoxicidade e genotoxicidade de microesferas de hidroxiapatita (HA) nanoestruturada contendo íons de estrôncio, zinco ou carbonato, sintetizadas a 5 °C. Os resultados do ensaio MTT indicaram citotoxicidade significativa apenas na concentração mais elevada (100 mg/mL), com redução significativa da viabilidade celular. Em concentrações menores (50 mg/mL), todas as amostras mantiveram a viabilidade acima de 70%, conforme estabelecido pela norma ISO 10993-5, indicando ausência de citotoxicidade relevante. Na avaliação da genotoxicidade pelo ensaio de CBMN, os eluatos preparados a partir das microesferas de HA nanoestruturada contendo Zn2+ e Sr2+ não induziram danos significativos ao DNA, apresentando frequências de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares comparáveis às do controle negativo. No entanto, os resultados obtidos com o material contendo CO_3^{2-} precisam ser confirmados.

Assim, este trabalho contribui para a validação preliminar das microesferas modificadas com íons Sr^{2+} e Zn^{2+} como candidatas promissoras para aplicações em terapias de regeneração óssea. Ressalta-se, entretanto, a necessidade de estudos adicionais, especialmente com maior replicação no ensaio CBMN, para consolidar a avaliação de segurança genotóxica.

Referências

ALMEIDA, Ricardo; HAYASHI, Carlos Roberto Massao. Capacity of social organization in socio-environmental confrontations. Revista Katálysis, v. 23, n. 2, p. 276, 2020.

DORNELAS, Jessica et al. The incorporation of zinc into hydroxyapatite and its influence on the cellular response to biomaterials: a systematic review. Journal of Functional Biomaterials, v. 15, n. 7, p. 178, 2024..

CAO, Shuai-shuai et al. Prefabricated 3D-printed tissue-engineered bone for mandibular reconstruction: a preclinical translational study in primate. ACS Biomaterials Science & Engineering, v. 7, n. 12, p. 5727-5738, 2021.

ROSA, A. L. et al. Effect of synthesis temperature on crystallinity, morphology and cell viability of nanostructured hydroxyapatite via wet chemical precipitation method: Effect of temperature on hydroxyapatite properties. International Journal of Advances in Medical Biotechnology, v. 5, n. 1, p. 29–35, 2022.

George, S. M. et al. Multifunctional hydroxyapatite composites for orthopedic applications: a review. ACS Biomaterials Science & Engineering, v. 8, n. 8, p. 3162-3186, 2022.

ESEN, Merve et al. Evaluation of the genotoxicity, cytotoxicity, and bioactivity of calcium silicate-based cements. BMC Oral Health, v. 24, n. 1, p. 119, 2024.

MIRON, Richard J. Optimized bone grafting. Periodontology 2000, v. 94, n. 1, p. 143-160, 2024.

BELOTI, Marcio Mateus; ROSA, Adalberto Luiz. Bone Regeneration and Repair Materials. Journal of Functional Biomaterials, v. 15, n. 3, p. 78, 2024.

CIOSEK, Żaneta et al. The effects of calcium, magnesium, phosphorus, fluoride, and lead on bone tissue. Biomolecules, v. 11, n. 4, p. 506, 2021.

DE BRITO, Josimar Elpídio et al. Genotoxicidade das nanoestruturas aplicadas em saúde: uma revisão integrativa. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 13, n. 3, p. e6298-e6298, 2021.

DE SOUZA, Augusto Monteiro et al. Are hydroxyapatite-based biomaterials free of genotoxicity? A systematic review. Chemosphere, v. 352, p. 141383, 2024.

DEC, Paweł; MODRZEJEWSKI, Andrzej; PAWLIK, Andrzej. Existing and novel biomaterials for bone tissue engineering. International journal of molecular sciences, v. 24, n. 1, p. 529, 2022.

DORNELAS, Jessica et al. The incorporation of zinc into hydroxyapatite and its influence on the cellular response to biomaterials: a systematic review. Journal of Functional Biomaterials, v. 15, n. 7, p. 178, 2024.

FARABAUGH, Christopher S. et al. In vitro micronucleus assay: Method for assessment of nanomaterials using cytochalasin B. Frontiers in Toxicology, v. 5, p. 1171960, 2023.

FENECH, Michael et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature protocols, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

CODREA, Cosmin Iulian et al. Three-Dimensional-Printed Composite Scaffolds Containing Poly-ε-Caprolactone and Strontium-Doped Hydroxyapatite for Osteoporotic Bone Restoration. Polymers, v. 16, n. 11, p. 1511, 2024.

GHASEMI, Mahshid et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

VIMALRAJ, Selvaraj; SARAVANAN, Sekaran. Tooth-derived stem cells integrated biomaterials for bone and dental tissue engineering. Cell and Tissue Research, v. 394, n. 2, p. 245-255, 2023.

FARAZIN, Ashkan; MAHJOUBI, Soroush. Dual-functional Hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration and precision drug delivery. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 157, p. 106661, 2024.

GHASEMI, Mahshid et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

Iso P. 10993–5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. ISO: Geneva, Switzerland, 2009.

KAVASI, Rafaela-Maria et al. In vitro biocompatibility assessment of nano-hydroxyapatite. Nanomaterials, v. 11, n. 5, p. 1152, 2021.

LI, Cairong et al. Preparation and evaluation of osteogenic nano- MgO/PMMA bone cement for bone healing in a rat critical size calvarial defect. Journal of Materials Chemistry B, v. 8, n. 21, p. 4575-4586, 2020.

ELAKKIYA, K.; BARGAVI, P.; BALAKUMAR, S. 3D interconnected porous PMMA scaffold integrating with advanced nanostructured CaP-based biomaterials for rapid bone repair and regeneration. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 147, p. 106106, 2023.

OCDE, O. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Publishing, n. July, p.29, 2016.

SALEM, Salem S.; MEKKY, Alsayed E. Biogenic nanomaterials: Synthesis, characterization, and applications. In: Biogenic Nanomaterials for Environmental Sustainability: Principles, Practices, and Opportunities. Cham: Springer International Publishing, 2024. p. 13-43.

SONMEZ, E. et al. Toxicity assessment of hydroxyapatite nanoparticles in rat liver cell model in vitro. Human & experimental toxicology, v. 35, n. 10, p. 1073-1083, 2016.

WANG, Liting et al. Nano-hydroxyapatite particles induce apoptosis on MC3T3-E1 cells and tissue cells in SD rats. Nanoscale, v. 4, n. 9, p. 2894-2899, 2012.

Anexos



Figura 1 – Avaliação da citotoxicidade das amostras pelo ensaio de MTT. Células CHO-K1 foram tratadas com os eluatos preparados a partir das microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada produzidas a 5 °C, na concentração de 50 mg/mL.



Figura 2 – Avaliação da citotoxicidade das amostras pelo ensaio de MTT. Células CHO-K1 foram tratadas com os eluatos preparados a partir das microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada produzidas a 5 °C, na concentração de 100 mg/mL.

CÓDIGO: SB0764

AUTOR: FELIPE ALEXANDRE CORDEIRO FERNANDES

COAUTOR: EDUARDA OLIVEIRA DE SOUZA

COAUTOR: EMILLY RIBEIRO DE SOUZA OLIVEIRA

COAUTOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

COAUTOR: ALICE DE MORAES CALVENTE

ORIENTADOR: ALEXANDRE FADIGAS DE SOUZA

TÍTULO: Florestas semidecíduas, decíduas e rigidifoliadas ocupam o mesmo envelope climático/edáfico?

Resumo

O estudo avalia a coerência dos conceitos de DTSFW e SDTF, analisando se fisionomias vegetais da América Latina e Caribe ocupam ecossistemas ambientalmente distintos. Com dados de 3200 locais do banco NeoTropTree, dados de clima e solo, o trabalho calculou hipervolumes climáticos, altitudinais e edáficos das fisionomias por Análises de Componentes Principais (PCA). Os resultados revelam forte diferenciação abiótica entre as formações. As florestas semidecíduas mistas ocupam o maior envelope climático em altitudes elevadas com forte variação térmica. No extremo oposto, as florestas espinhosas ocupam climas quentes e secos com déficit hídrico severo. No solo, as mistas associam-se a solos vulcânicos, argilosos e férteis, enquanto as florestas espinhosas ocupam solos arenosos, rasos, pedregosos e alcalinos. As florestas latifoliadas decíduas e semidecíduas exibem alta sobreposição, mas diferem sutilmente: As semidecíduas toleram solos mais ácidos e pobres próximos a áreas úmidas, enquanto as decíduas preferem solos férteis e alcalinos de encostas. Conclui-se que o conceito de DTSFW abriga fisionomias com envelopes ambientais específicos. Individualizá-las é crucial para planejar estratégias eficazes de conservação e restauração florestal sob mudanças climáticas globais.

Palavras-chave: Florestas secas. DTSFW. Diferenciação abiótica. Clima. Solo.

TITLE: Do semideciduous, deciduous and sclerophyllous forests share the same climatic-edaphic envelope?

Abstract

This study evaluates the conceptual coherence of DTSFW and SDTF, analyzing whether plant physiognomies in Latin America and the Caribbean occupy environmentally distinct ecosystems. Using data from 3200 localities sourced from the NeoTropTree database, alongside climate and soil data, we calculated climatic, altitudinal and edaphic hypervolumes for each physiognomy via Principal Component Analysis (PCA). The results reveal a strong abiotic differentiation among formations. Mixed semideciduous forests occupy the broadest climatic envelope at high elevations with high thermal variation. On the opposite extreme, thorn woodlands inhabit hot, dry climates with severe water deficits. Regarding soil properties, mixed forests are associated with fertile, clayey volcanic soils, whereas thorn woodlands occupy sandy, shallow, stony and alkaline soils. Deciduous and semideciduous broadleaf forests exhibit high overlap yet differ subtly: Semideciduous forests tolerate more acidic, nutrient-poor soils near wetland areas, whereas deciduous forests prefer fertile, alkaline slope soils. We conclude that the DTSFW concept encompasses physiognomies with specific environmental envelopes. Distinguishing them is crucial for planning effective conservation and forest restoration strategies under global climate change.

Keywords: Dry forests. DTSFW. Abiotic differentiation. Climate. Soil.

Introdução

Diferentes fisionomias sazonais são frequentemente referidas por nomes regionais ou termos amplos como “tropical dry forest biome” (Dexter et al., 2018; Slik et al., 2018) ou Florestas Tropicais Sazonalmente Secas (SDTF) (Pennington, 2009; Linares-Palomino, 2011). Diante da considerável heterogeneidade ecológica das SDTF, adotamos aqui a denominação conjunta Dry Tropical and Subtropical Forests and Woodlands (DTSFW). Essa escolha reconhece que as vegetações secas subtropicais apresentam continuidades e transições funcionais, filogenéticas e florísticas com as SDTF (Linares-Palomino et al., 2011; Slik et al., 2018), contemplando o gradiente gerado pela sazonalidade das chuvas entre florestas pluviais e desertos, incluindo formações abertas (Queiroz et al., 2017).
As florestas semidecíduas apresentam menor biomassa e estrutura que as pluviais, abundância de lianas e perda de até 60% da massa foliar no período seco/frio (Beard, 1944; Oliveira-Filho, 2009). As florestas decíduas possuem menor porte, perdem mais de 60% das folhas na estiagem e exibem flora empobrecida, com lianas, epífitas e herbáceas escassas (Beard, 1944; Oliveira-Filho, 2009; Navarro e Molina, 2021). As matas e arbustais espinhosos (“thorn woodland” e “cactus scrub” – Beard, 1944; “thorn woodland and shrubland” – Navarro e Molina, 2021; Savana Estépica Arborizada – IBGE, 2012) reúnem árvores baixas e arbustos decíduos, espinhosos e com folhas reduzidas contra a transpiração, baixa riqueza arbórea e estrato herbáceo restrito (Beard, 1944). O arbustal com cactos (“cactus scrub” ou arbustal denso xeromórfico – Navarro e Molina, 2021; arbustal rigidifoliado – Oliveira-Filho, 2009; Savana Estépica Parque – IBGE, 2012) é aberto, dominado por arbustos esparsos e suculentas, com espinhos e sistema radicular desenvolvido (Beard, 1944). As florestas subtropicais mistas de coníferas e angiospermas das serras mexicanas (>1000 m, Bosque Mixto de Pino-

Encino) têm dossel de Pinus e subdossel de angiospermas decíduas (Quercus), mantendo caráter semidecíduo (Gómez-Pompa, 1965; Rzedowski, 2006) e ocorrem em solos vulcânicos férteis, com alto teor de C e N (Gardi et al., 2014; Bourg e Riaño, 2025).

Evidências indicam que os tipos de DTSFW derivam de variações na severidade da seca e de contrastes topográficos e edáficos – de solos férteis e rasos a arenosos e profundos (Van Bloem et al., 2004; Rivero-Villar et al., 2022). A interação desses fatores molda regimes de estresse hídrico que condicionam a estrutura, biomassa subterrânea, distribuição, serviços ecossistêmicos, funcionamento e composição das DTSFW (Arruda et al., 2015; Murphy e Lugo, 1986, 1995; Menaut et al., 1995; Oliveira-Filho et al., 2013, 2015; Santos et al., 2012).

Neste trabalho, avaliamos a coerência interna dos conceitos de DTSFW e SDTF, respondendo se as vegetações agrupadas sob esses termos na América Latina e Caribe correspondem a ecossistemas ambientalmente distintos (clima, solo e topografia).

Metodologia

Utilizamos dados de composição florística presentes na base de dados NeoTropTree (http://www.neotroptree.info/), NTT daqui em diante (Oliveira-Filho, 2015). A NTT reúne dados sobre espécies arbóreas nativas da região neotropical compiladas entre 1992 e 2017. A NTT classifica as florestas secas com características xéricas como “florestas rigidifoliadas” (Oliveira-Filho, 2015), mas nós optamos por usar o termo “floresta espinhosa” (thorn woodland) devido ao seu uso mais comum na literatura (e.g. Beard, 1944; Murphy e Lugo, 1995) e também pelo fato de que a deciduidade com produção de folhas de baixo custo e pouco fibrosas na estação chuvosa é uma estratégia ecológica mais comum nessas fisionomias do que a esclerofilia (Ferri, 1955; Fagundes et al., 2022). Com isso, selecionamos um total de 3200 locais distribuídos pela América Latina e Caribe (Figura 1).

Para a análise dos dados florestais, usamos a abordagem de hipervolumes (Blonder et al., 2014; Blonder, 2018) como base para calcular o espaço climático e altitudinal, edáfico, taxonômico, filogenético e funcional ocupados pelos diferentes tipos de florestas secas, bem como sua sobreposição em áreas de DTSFW na América Latina. Os dados climáticos incluíram 17 variáveis bioclimáticas e a elevação, os quais estavam presentes como metadados na base de dados NTT. Os dados de solo foram obtidos do SoilGrid 2.0 (Poggio, 2021) em uma resolução de 250 m para o horizonte de superfície (0-5 cm de profundidade).

Fizemos a harmonização taxonômica dos nomes das espécies obtidas da base de dados NTT utilizando como backbone a base de dados World Flora Online 2023.12 (antigo The Plant List, https://www.worldfloraonline.org) através do pacote U.Taxonstand 1.3.2 (Jian e Qian, 2023), substituindo sinônimos e nomes com erros ortográficos pelos nomes aceitos das espécies. A lista final com 9014 espécies foi usada em uma matriz de presença e ausência nos 3200 locais selecionados.

Adotamos a estrutura baseada em distâncias (Laliberté e Legendre, 2010; Carvalho e Cardoso, 2020) que envolve: O cálculo de distâncias ecológicas significativas a partir da matriz de variáveis locais ou de espécies; a realização de uma ordenação sobre a matriz de distâncias; e, o uso dos eixos de ordenação como novas variáveis para o cálculo do hipervolume. Foram feitas análises de hipervolumes separadas para dados climáticos, de elevação e de solo. Para as análises climática e edáfica, utilizamos uma Análise de Componentes Principais (PCA).

Os hipervolumes foram calculados sobre os scores dos eixos de cada ordenação usando o pacote hypervolume 3.1.6 que emprega estimativas de bandas de kernel multidimensionais sob método gaussiano, sendo o parâmetro kde.bandwidth estimado automaticamente via método de Silverman.

Resultados e Discussões

Os hipervolumes de clima e elevação dos diferentes tipos de DTSFW foram calculados com base nos 4 primeiros eixos do PCA, que explicaram juntos 83,7% da variação nos dados. Esses eixos capturaram gradientes climáticos relacionados à temperatura (eixo 1), precipitação e severidade da estação seca (eixo 2), excesso hídrico na estação chuvosa (eixo 3) e amplitude térmica (eixo 4). Esses gradientes estruturam a distribuição geográfica das DTSFW na América Latina, separando áreas tropicais quentes e secas na América Central, nordeste do Brasil e litoral pacífico de regiões subtropicais, interiores ou de altitude, onde predominaram maior sazonalidade térmica e ocorrência de extremos hídricos como no centro-sul do Brasil, no México e nas encostas dos Andes colombianos.

As florestas semidecíduas mistas tiveram de longe o maior volume entre os hipervolumes climáticos dos diferentes tipos de DTSFW, enquanto os demais tipos florestais tiveram volumes semelhantes e cerca de 2,5 vezes menores que os volumes das florestas mistas (Figura 3a). A maioria dos pares de tipos de DTSFW mostraram baixa sobreposição (similaridade de Jaccard $\leq 20\%$). A sua diferenciação ocorreu principalmente ao longo do gradiente capturado pelos eixos 1 (temperatura) e 3 (chuva e excesso hídrico) do PCA, com as florestas espinhosas ocupando o extremo mais seco do eixo 3, com menor chuva anual e do mês mais úmido e as florestas semidecíduas mistas ocupando o extremo mais úmido (Figura 3b). As florestas mistas se diferenciam pela ocupação das porções negativas de todos os 4 eixos do PCA, região com pouca sobreposição e com os espaços ocupados pelos demais tipos florestais (Figura 3b). Essas regiões corresponderam às altas elevações, grande amplitude de temperatura anual e chuva sazonal, porém em quantidades altas em relação aos demais tipos de DTSFW (Figura 3d). As florestas latifoliadas semidecídua e decídua apresentaram a maior sobreposição de nichos climáticos (similaridade $\approx 50\%$, Figura 3c), ocupando áreas do espaço climático com precipitação relativamente alta e duração do período com déficit hídrico curto em comparação com as florestas esclerófilas e semidecídua mista (Figura 3d). As florestas decíduas latifoliadas tiveram uma sobreposição de espaço climático moderada com as florestas decíduas esclerófilas, que ocuparam os extremos climáticos de menor chuva anual, maior duração da estação seca e maiores temperaturas (Figura 3b-d). Também foi interessante a existência de disjunções das florestas espinhosas para algumas áreas mais altas e com amplitude térmica maior (lado negativo do PC1, Figura 3b,d) e de florestas semidecíduas latifoliadas em áreas altas, com grande amplitude térmica, porém com maior precipitação anual e estação seca suave (lado negativo do PC1 e positivo do PC2, Figura 3b,d).

Os hipervolumes edáficos dos diferentes tipos de DTSFW foram definidos com base nos 3 primeiros eixos do PCA de solo, que juntos explicaram 79,5% da variação nos dados. O eixo 1 representou principalmente um gradiente de fertilidade e textura, distinguindo solos mais argilosos, ricos em matéria orgânica e nutrientes, de solos arenosos e densos, amplamente distribuídos entre o Caribe, México, Andes, sul e centro do Brasil. O eixo 2 destacou o contraste entre solos mais alcalinos e grosseiros, predominantes nos Andes, Caatinga e deserto de Chihuahua, e solos ácidos e finos do

Brasil e norte da América do Sul. Por fim, o eixo 3 capturou variações dentro dos solos finos, separando áreas mais siltosas e densas, notadamente no Chaco, Caribe e nordeste do México, em oposição a áreas mais arenosas.

As florestas decíduas latifoliadas tiveram o maior volume entre os hipervolumes de solo entre os diferentes tipos de DTSFW e as florestas semidecíduas latifoliadas tiveram um volume intermediário. Por sua vez, as florestas espinhosas e as semidecíduas mistas tiveram volumes cerca de 3 vezes menores do que o tipo florestal com maior volume (Figura 4a). Os dois tipos florestais com maiores volumes também tiveram a maior sobreposição de hipervolumes edáficos (≈ 50%), principalmente no eixo 1 (nutrição e textura) do PCA de solo (Figura 4c). Sua diferenciação se deu principalmente ao longo do eixo 2, com as florestas semidecíduas latifoliadas ocupando solos mais finos e ácidos do que as decíduas latifoliadas, mais frequentes em solos mais alcalinos e com fragmentos mais grossos (Figura 4b,d). Sobreposições moderadas (≈ 30%) ocorreram entre as florestas espinhosas em relação às decíduas e semidecíduas latifoliadas. Sua diferenciação se deu principalmente ao longo do eixo 2 do PCA, com as florestas espinhosas ocupando solos bem mais alcalinos e com fragmentos grossos do que as florestas latifoliadas (Figura 4b,d). As florestas semidecíduas mistas foram as que mais ocuparam solos diferenciados em relação aos demais tipos florestais (sobreposição de ≈ 20-25%, Figura 4b). Sua diferenciação ocorreu no eixo 1 do PCA, com as florestas mistas ocorrendo em solos consideravelmente mais nutritivos e argilosos do que os demais tipos florestais, que se distribuíram ao longo de solos mais pobres e arenosos. Essa diferenciação também se confirmou no eixo 3, com as florestas mistas ocorrendo em solos mais arenosos e soltos (Figura 4b,d).

Apesar de uma ampla literatura ter sido produzida sobre diferenças florísticas entre biomas nas últimas décadas, principalmente neotropicais, a distribuição geográfica dos tipos de vegetação independente da sua composição e seus correlatos abióticos têm recebido relativamente menos atenção. Caracterizações e modelagens anteriores do ambiente abiótico das DTSFW não individualizaram as diferentes fisionomias (Murphy e Lugo, 1986; Van Bloem et al., 2004; Pennington et al., 2006; Londe et al., 2023). Nossos resultados indicaram que os 4 tipos de DTSFW estudados apresentaram considerável diferenciação entre si e ocuparam regiões diferentes tanto no espaço climático e de elevação quanto no edáfico. As florestas semidecíduas mistas do México e da América Central, como as florestas montanas de Pinus-Quercus, ocuparam a maior amplitude climática com maior volume devido a sua ampla distribuição altitudinal e extremos de temperatura, embora restritas a solos mais férteis. Esse resultado corresponde à caracterização edafoclimática dessas florestas feitas precocemente (Gomez-Pompa, 1965; Rzedowski, 2006). Os solos sobre os quais elas ocorrem têm origem vulcânica com concentrações elevadas de Ca, Mg, K (Gardi et al., 2014; Bourg e Riaño, 2025). Além disso, a presença maciça de coníferas e a produtividade elevada geram um acúmulo significativo de C e N nessas áreas (Bourg e Riaño, 2025).

As florestas espinhosas se diferenciaram por ocuparem os climas com estação seca mais marcada com mais longos períodos com déficit hídrico e em geral, mais quentes e com solos relativamente mais arenosos, densos, pedregosos e pobres em matéria orgânica e N. Esse resultado concorda com a descrição feita para a distribuição das florestas espinhosas no domínio da Caatinga no nordeste brasileiro, distribuídas nas terras baixas, climas semiáridos e na sombra de chuva de acidentes topográficos (Moro et al., 2024). As florestas espinhosas do Chaco produziram uma extensão da ocupação do espaço climático e topográfico em direção às áreas com grande amplitude térmica, já que o Chaco ocupa tanto áreas baixas como montanhosas e tem verões muito quentes e invernos frios com geadas (Prado, 1993). Em comparação com outros tipos de DTSFW

na América Latina, as florestas espinhosas se diferenciaram por serem as formações que se estabeleceram nos subsetores edáficos mais restritivos. As florestas espinhosas são conhecidas por ocorrerem principalmente em regiões com precipitação anual abaixo do limiar de 1000-1200 mm (Oliveira-Filho et al., 2013). As florestas espinhosas e decíduas latifoliadas se segregam ao longo de um gradiente de aridez, profundidade e pedregosidade do solo, com as decíduas latifoliadas ocorrendo em uma gama maior de precipitações mais altas (Santos et al., 2012) e solos mais profundos e férteis (Murphy e Lugo, 1995; Dexter et al., 2018) frequentemente em áreas ecotonais com savanas (Moro et al., 2024). Além disso, nossos resultados concordam com descrições da distribuição local dessa fisionomia e com a fertilidade reduzida dos solos de DTSFW nas áreas mais secas da América Latina e Caribe quando a comparação é feita apenas entre áreas sazonalmente secas (Rivero-Villar et al., 2022).

Como observado por Rivero-Villar et al. (2022), revisões sobre as DTSFW têm ressaltado que esses ecossistemas costumam ocorrer em solos alcalinos e ricos em nutrientes em comparação com os solos ácidos, lixiviados e pobres em nutrientes das florestas tropicais chuvosas e das savanas (Pennington et al., 2006; Dexter et al., 2018). Entretanto, tem sido apontado que metade ou mais dos solos das DTSFW são na realidade pobres (Van Bloem et al., 2004; Rivero-Villar et al., 2022) e nossos resultados indicam que uma parte significativa da imensa variedade de solos e litologias ocupadas pelas DTSFW parecem corresponder aos diferentes tipos de vegetação geralmente não reconhecidos e associados com substratos diferenciados. Essa correspondência, entretanto, não é absoluta e em alguns casos regionais solos argilosos e solos sedimentares podem ser cobertos por variações semelhantes de floresta espinhosa (e.g. na Caatinga, Londe et al., 2023).

As florestas latifoliadas semidecíduas e decíduas foram as que tiveram maior similaridade climática e edáfica. Apesar disso, elas se diferenciam em vários aspectos ainda que de forma mais sutil do que as diferenças entre as outras fisionomias (Menaut et al., 1995). As florestas semidecíduas estão mais próximas das florestas pluviais no gradiente climático que define as DTSFW, ocorrendo em grandes áreas no interior da Floresta Atlântica brasileira, como manchas nas savanas do Cerrado do Brasil central e nas margens da floresta Amazônica com menor duração da estação chuvosa (Dexter et al., 2018; Moro et al., 2024). Além disso, elas ocorrem sobre solos mais ácidos, com textura mais grossa e pobres em bases trocáveis do que as florestas decíduas. Já nos relevos erodidos das chapadas e vales do Brasil central, as florestas decíduas latifoliadas estão associadas a encostas e terras baixas, solos nutritivos que sustentam uma biomassa florestal e um dossel fechado na estação chuvosa capaz de inibir a proliferação de gramíneas e do fogo, assim como a própria deciduidade, que é demandante em termos nutricionais (Arruda et al., 2015; Dexter et al., 2018). Nossas análises de hipervolumes climáticos e edáficos indicam que tipos diferentes de DTSFW se diferenciaram ao longo dos eixos de severidade do déficit hídrico, textura e fertilidade do solo, o que ajuda a explicar muito da variação interna constatada entre locais diferentes classificados somente como “florestas secas” (Murphy e Lugo, 1995).

Conclusão

Os resultados deste trabalho evidenciam que as diferentes fisionomias que integram as DTSFW na América Latina e Caribe não compartilham o mesmo envelope ambiental, rejeitando visões excessivamente homogeneizadoras. A análise de hipervolumes climáticos e edáficos confirmou uma considerável diferenciação ecológica entre as 4

formações vegetais estudadas, demonstrando que termos abrangentes como SDTF mascaram uma heterogeneidade crítica de nichos ecológicos e de realidades abióticas. No gradiente climático, as florestas semidecíduas mistas destacam-se por apresentarem o maior volume de nicho ocupado, estabelecendo-se predominantemente em altitudes elevadas com forte amplitude térmica anual e precipitação sazonal relativamente alta. No extremo oposto, as florestas espinhosas segregam-se por ocupar os climas mais quentes e secos, marcados por déficits hídricos severos e prolongados. Por sua vez, embora as florestas latifoliadas decíduas e semidecíduas compartilhem a maior similaridade climática (≈50%), elas se diferenciam de forma sutil: As semidecíduas localizam-se em áreas de menor duração do déficit hídrico e maior proximidade de florestas úmidas, enquanto as decíduas ocupam faixas de maior estresse hídrico sazonal. No gradiente edáfico, a segregação das fisionomias é igualmente pronunciada, desmistificando a premissa de que as florestas secas ocorrem unicamente em solos ricos e férteis. As florestas semidecíduas mistas ocupam solos de origem vulcânica excepcionalmente argilosos, férteis e enriquecidos com C e N acumulados por sua alta produtividade. Em contrapartida, as florestas espinhosas habitam as condições edáficas mais restritivas da região neotropical, fortemente associadas a solos arenosos, rasos, pedregosos e altamente alcalinos. Entre as formações latifoliadas, que também mostram sobreposição edáfica de ≈50%, as florestas semidecíduas toleram solos significativamente mais ácidos, finos e pobres em bases, ao passo que as florestas decíduas se restringem a terrenos mais alcalinos, férteis e pedregosos de encostas e terras baixas.

Dessa forma, conclui-se que o conceito de DTSFW abriga unidades ecossistêmicas funcional e ambientalmente distintas. A individualização de seus respectivos envelopes climáticos, altitudinais e edáficos é crucial, pois revela que as respostas dessas fisionomias a perturbações e estresses hídricos são específicas de cada formação. Compreender essas nuances ecológicas detalhadas é, portanto, indispensável para desenhar estratégias precisas de conservação, restauração florestal e modelagem de impactos diante dos cenários futuros de mudanças climáticas globais.

Este trabalho foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu bolsa de Iniciação Científica ao autor. Agradecemos a Leonardo Silva e a toda equipe da STI/UFRN por viabilizarem o uso da máquina virtual para as análises de dados e a Daniel Chen pelas sugestões nas análises de hipervolumes.

Referências

ARRUDA, D. M. et al. Landforms and soil attributes determine the vegetation structure in the Brazilian semiarid. Folia Geobotanica, v. 50, n. 3, p. 175-184, set. 2015.

BEARD, J. S. Climax Vegetation in Tropical America. Ecology, v. 25, n. 2, p. 127-158, abr. 1944.

BLONDER, B. Hypervolume concepts in niche- and trait-based ecology. Ecography, v. 41, n. 9, p. 1441-1455, set. 2018.

BLONDER, B. et al. The n-dimensional hypervolume. Global Ecology and Biogeography, v. 23, n. 5, p. 595-609, maio 2014.

BOURG, A.; RIAÑO, K. Evaluation of the relationship between soil properties and functional traits in three forest types in a subtropical mountain in Mexico. Botany, v. 103, p. 1-12, jan. 2025.

CARVALHO, J. C.; CARDOSO, P. Decomposing the Causes for Niche Differentiation

Between Species Using Hypervolumes. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 8, jul. 2020.
DEXTER, K. G. et al. Inserting Tropical Dry Forests Into the Discussion on Biome Transitions in the Tropics. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 6, jul. 2018.
FAGUNDES, M. V. et al. Functional traits above and below ground allow species with distinct ecological strategies to coexist in the largest seasonally dry tropical forest in the Americas. Frontiers in Forests and Global Change, v. 5, out. 2022.
FERRI, M. G. Contribuição ao Conhecimento da Ecologia do Cerrado e da Caatinga. Estudo Comparativo da Economia D'água de sua Vegetação. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. Botânica, São Paulo, v. 12, n. 0, p. 7, nov. 1955.
GARDI, C. et al. (ed.). Atlas de suelos de América Latina y el Caribe. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2014.
GÓMEZ-POMPA, A. La vegetación de México. Botanical Sciences, n. 29, p. 76-120, jul. 1965.
IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira. 2. ed. IBGE, 2012.
JIN, Y.; QIAN, H. U.PhyloMaker: An R package that can generate large phylogenetic trees for plants and animals. Plant Diversity, v. 45, n. 3, p. 347-352, maio 2023.
LALIBERTÉ, E.; LEGENDRE, P. A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits. Ecology, v. 91, n. 1, p. 299-305, jan. 2010.
LINARES-PALOMINO, R.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; PENNINGTON, R. T. Neotropical Seasonally Dry Forests: Diversity, Endemism, and Biogeography of Woody Plants. In: DIRZO, R. et al. (ed.). Seasonally Dry Tropical Forests: ecology and conservation. Washington, DC: Island Press/Center for Resource Economics, 2011. p. 3-21.
LONDE, V.; GOMES, P. W. P.; MARTINS, F. R. The role of edaphic differentiation on life zones, vegetation types, β-diversity, and indicator species in tropical dry forests. Plant and Soil, v. 493, n. 1-2, p. 573-588, dez. 2023.
MENAUT, J.-C.; LEPAGE, M.; ABBADIE, L. Savannas, woodlands and dry forests in Africa. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (ed.). Seasonally Dry Tropical Forests. Cambridge University Press, 1995. p. 64-92.
MORO, M. F. et al. Biogeographical Districts of the Caatinga Dominion: A Proposal Based on Geomorphology and Endemism. The Botanical Review, v. 90, n. 4, p. 376-429, dez. 2024.
MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. Dry forests of Central America and the Caribbean. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (ed.). Seasonally Dry Tropical Forests. Cambridge University Press, 1995. p. 9-34.
MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. Ecology of Tropical Dry Forest. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 17, n. 1, p. 67-88, nov. 1986.
NAVARRO, G.; MOLINA, J. A. A novel biome concept and classification system based on bioclimate and vegetation – a Neotropical assay. Vegetation Classification and Survey, v. 2, p. 159-175, out. 2021.
OLIVEIRA-FILHO, A. Um sistema de classificação fisionômico-ecológico da vegetação neotropical: segunda aproximação. In: EISENLOHR, P. V. et al. (coord.). Fitossociologia no Brasil: métodos e estudos de casos. 2015. v. 2.
OLIVEIRA-FILHO, A. T. Classificação das fitofisionomias da América do Sul cisandina tropical e subtropical: proposta de um novo sistema - prático e flexível - ou uma injeção a mais de caos? Rodriguésia, v. 60, n. 2, p. 237-258, jun. 2009.
OLIVEIRA-FILHO, A. T. et al. Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests. Journal

of Plant Ecology, v. 8, n. 3, p. 242-260, jun. 2015.
OLIVEIRA-FILHO, A. T. et al. Stability structures tropical woody plant diversity more than seasonality: Insights into the ecology of high legume-succulent-plant biodiversity. South African Journal of Botany, v. 89, p. 42-57, nov. 2013.
PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M.; OLIVEIRA-FILHO, A. Woody Plant Diversity, Evolution, and Ecology in the Tropics: Perspectives from Seasonally Dry Tropical Forests. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 40, n. 1, p. 437-457, dez. 2009.
PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G.; RATTER, J. An Overview of the Plant Diversity, Biogeography and Conservation of Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (ed.). Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests: plant diversity, biogeography, and conservation. 2006. p. 1-29.
POGGIO, L. et al. SoilGrids 2.0: producing soil information for the globe with quantified spatial uncertainty. SOIL, v. 7, n. 1, p. 217-240, jun. 2021.
PRADO, D. What is the Gran Chaco vegetation in South America? I. A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. V. Candollea, v. 48, p. 145-172, jan. 1993.
QUEIROZ, L. P. de et al. Diversity and Evolution of Flowering Plants of the Caatinga Domain. In: SILVA, J. M. C. da; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. (ed.). Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 23-63.
RIVERO-VILLAR, A. et al. A Pantropical Overview of Soils across Tropical Dry Forest Ecoregions. Sustainability, v. 14, n. 11, p. 6803, jun. 2022.
RZEDOWSKI, J. Vegetación de México. México. 2006.
SANTOS, R. M. et al. Identity and relationships of the Arboreal Caatinga among other floristic units of seasonally dry tropical forests (SDTFs) of north-eastern and Central Brazil. Ecology and Evolution, v. 2, n. 2, p. 409-428, fev. 2012.
SLIK, J. W. F. et al. Phylogenetic classification of the world's tropical forests. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 8, p. 1837-1842, fev. 2018.
VAN BLOEM, S.; LUGO, A. E.; MURPHY, P. G. Regional Forest Types - Tropical Dry Forests. 2004.
WERNECK, F. P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. Quaternary Science Reviews, v. 30, n. 13-14, p. 1630-1648, jun. 2011.

Anexos



Figura 1 Distribuição geográfica das florestas tropicais e subtropicais sazonalmente secas estudadas (pontos utilizados da base de dados NeoTropTree). Veja a Figura 2 para mapas separados por tipo de vegetação.



Figura 2 Distribuição geográfica das florestas estudadas, separadas por tipo de vegetação.



Figura 3 Ocupação do nicho climático e de elevação por diferentes tipos de DTSFW. a) Distribuição dos volumes dos hipervolumes de cada tipo de DTSFW downsampled e reamostrado. b) Densidade de locais de cada tipo de DTSFW no espaço multivariado do PCA. c)



Figura 4 Ocupação do nicho de solo por diferentes tipos de DTSFW. a) Distribuição dos volumes dos hipervolumes de cada tipo de DTSFW downsampled e reamostrado. b) Densidade de locais de cada tipo de DTSFW no espaço multivariado do PCA. c) Sobreposição do

CÓDIGO: SB0767

AUTOR: NATALIA PENELOPE ARAUJO FERNANDES

ORIENTADOR: RIVA DE PAULA OLIVEIRA

TÍTULO: O papel das proteínas EXO-3/APE1 e XPA-1/XPA no potencial de membrana e apoptose no Caenorhabditis elegans

Resumo

Deficiências nas vias de reparo por excisão de bases (BER) e de nucleotídeos (NER) estão associadas a doenças neurodegenerativas, indicando seu papel essencial na manutenção da integridade genômica. A falha na NER leva à ativação contínua da PARP1 e à redução de NAD+, contribuindo para disfunção celular. Já a relação entre BER e disfunção mitocondrial ainda não está totalmente esclarecida, assim como sua interação com a NER. O nematódeo Caenorhabditis elegans é um modelo amplamente utilizado para estudar neurodegeneração, pois suas vias BER e NER são altamente conservadas. Nesse organismo, EXO-3 (homóloga à APE1 da BER) e XPA-1 (NER) são essenciais. Mutantes exo-3 apresentam aumento de ROS, redução da progênie e deleções em DNA mitocondrial, enquanto mutantes xpa-1 são sensíveis à radiação UV e apresentam disfunções no sistema ubiquitina-proteassoma e no metabolismo mitocondrial. Neste estudo, avaliou-se o impacto das deficiências de EXO-3 e XPA-1 na integridade mitocondrial e no desenvolvimento de fenótipos neurodegenerativos em C. elegans transgênicos com GFP em mitocôndrias. Foram analisados animais knockdown para exo-3 e/ou xpa-1, além de efeitos sobre apoptose e integridade neuronal colinérgica. Os resultados indicaram sinais de neurodegeneração e disfunção mitocondrial, sugerindo sobreposição funcional entre BER e NER, além de aumento do conteúdo mitocondrial em duplo knockdown. Conclui-se que EXO-3 e XPA-1 são essenciais para compreender mecanismos de neurodegeneração.

Palavras-chave: BER. NER. APE-1. XPA. Disfunção mitocondrial. Neurodegeneração.

TITLE: The Role of EXO-3/APE1 and XPA-1/XPA Proteins in Membrane Potential and Apoptosis in Caenorhabditis elegans

Abstract

Deficiencies in the base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) pathways are associated with neurodegenerative diseases, highlighting their role in maintaining genomic integrity. NER failure leads to continuous PARP1 activation and NAD+ depletion, contributing to cellular dysfunction. However, the relationship

between BER, mitochondrial dysfunction, and NER remains unclear. The nematode Caenorhabditis elegans is widely used to study neurodegeneration due to its highly conserved BER and NER pathways. In this organism, EXO-3 (homologous to APE1 in BER) and XPA-1 (NER) are essential. exo-3 mutants show increased ROS, reduced progeny, and mitochondrial DNA deletions, while xpa-1 mutants are UV-sensitive and exhibit ubiquitin-proteasome and mitochondrial dysfunction. Here, the impact of EXO-3 and XPA-1 deficiencies on mitochondrial integrity and neurodegenerative phenotypes was evaluated in transgenic C. elegans expressing mitochondrial GFP. exo-3 and/or xpa-1 knockdown animals were analyzed for apoptosis and cholinergic neuronal integrity. Results indicated neurodegeneration and mitochondrial dysfunction, suggesting functional overlap between BER and NER, as well as increased mitochondrial content in double-knockdown animals. These findings support the importance of EXO-3 and XPA-1 in understanding neurodegenerative mechanisms.

Keywords: BER. NER. APE-1. XPA. Mitochondrial dysfunction. Neurodegeneration

Introdução

O metabolismo aeróbico, essencial à evolução eucariótica, gera espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido, H2O2 e radical hidroxila(Sies et al., 2017; Schieber & Chandel, 2014). O equilíbrio entre produção e neutralização das ROS é fundamental à homeostase. O excesso de ROS provoca estresse oxidativo e danos a lipídios, proteínas, carboidratos e ao DNA (Sies et al., 2017; Cadet & Davies, 2017). Estima-se que células humanas sofram 10^4–10^5 lesões no DNA diariamente, sendo os danos oxidativos os mais prevalentes (Cadet & Davies, 2017). Entre eles, destacam-se a 8-oxoguanina (8-oxoG) e a timina glicol, que comprometem o pareamento das bases (Freudenthal, 2017; Tiwari & Wilson, 2019). Essas alterações podem contribuir para câncer e doenças neurodegenerativas. Para preservar a integridade genômica, as células possuem mecanismos de reparo, entre os quais as vias de excisão de bases (BER) e de nucleotídeos (NER), que reparam desde lesões oxidativas até danos volumosos (Yu et al., 1999; Kumar et al., 2020; Melis et al., 2013). A BER atua principalmente sobre lesões pequenas e oxidativas. DNA glicosilases removem as bases danificadas, formando sítios AP, posteriormente processados por AP endonucleases, glicosilases e ligases (Dyrkheeva et al., 2016). Em Caenorhabditis elegans, a endonuclease EXO-3, homóloga à APE1 humana, exerce papel central nessa via, também relacionada à regulação de fatores de transcrição (Dyrkheeva et al., 2016; Priscyanne Barreto Siqueira et al., 2024). Alterações em APE1 estão associadas a câncer, disfunções imunológicas e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Mattar et al., 2018; Kwiatkowski et al., 2016; Leandro et al., 2015). A NER repara lesões volumosas e distorcidas, como dímeros de pirimidina e fotoprodutos 6-4 induzidos por radiação UV, além de algumas lesões oxidativas maiores (Melis et al., 2013). A NER possui os subtipos global e acoplado à transcrição, e XPA é fundamental para reconhecer o dano e recrutar o complexo de reparo (Borszéková Pulzová et al., 2020). Deficiências na NER estão relacionadas à síndrome de Cockayne e ao xeroderma pigmentoso, doenças associadas à neurodegeneração, sensibilidade à UV e envelhecimento prematuro (Liu et al., 2017; Krasikova et al., 2021). A persistência de danos no DNA também pode promover disfunção mitocondrial. A ativação excessiva da PARP1 pode esgotar o NAD+, prejudicando a função mitocondrial e a renovação por mitofagia (Fang et al.,

2014; Onishi et al., 2021). Esse processo pode aumentar o potencial de membrana, promover clivagem de proteínas mitocondriais e induzir parthanatos, mecanismo de morte celular associado a doenças neurodegenerativas (Chaitanya et al., 2010; Huang et al., 2022). O nematódeo C. elegans é um modelo relevante para estudar neurodegeneração devido à conservação de genes e vias metabólicas humanas (Culetto, 2000; Kaletta & Hengartner, 2006). Suas vias BER e NER são funcionalmente conservadas, incluindo EXO-3 e XPA-1, e sua manipulação genética permite gerar mutantes knockout para investigar deficiências específicas (Elsakrmy et al., 2020). Mutantes exo-3 apresentam aumento de ROS, deleções de DNA mitocondrial, menor longevidade e dificuldades de motilidade, enquanto mutantes xpa-1 são sensíveis à UV e apresentam alterações no proteassoma e no metabolismo mitocondrial (Arczevska et al., 2013; De Sousa Leal et al., 2020). Estudos anteriores mostram que a deficiência simultânea de BER e NER exacerba alterações no potencial de membrana mitocondrial e induz fenótipos neurodegenerativos em C. elegans (Cadavid, 2021; Gupta et al., 2021). Entretanto, o RNAi apresenta limitações, especialmente em neurônios, devido à baixa expressão de SID-1 (Calixto et al., 2010). Assim, cepas knockout para exo-3 e xpa-1 com marcadores fluorescentes neuronais podem permitir uma análise mais detalhada dessas proteínas e de sua relação com a neurodegeneração.

Metodologia

Cepas

Para investigar o papel das proteínas EXO-3/APE1 e XPA-1/XPA nas vias BER e NER sobre a dinâmica mitocondrial e a neurodegeneração em Caenorhabditis elegans, serão utilizadas cepas mutantes knockout para os genes exo-3 (ok3539), xpa-1 (ok698), e parp-1 (ok988)(Estas cepas serão obtidas junto ao Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Para o monitoramento da apoptose, serão empregadas cepas transgênicas expressando proteínas fluorescentes específicas. MD701 expressa CED-1::GFP para detectar apoptose em células da bainha.

Manutenção e Sincronização dos Animais

Os vermes serão mantidos a 20ºC em placas com meio Nematode Growth Medium (NGM) enriquecido (NaCl, peptona, ágar bacteriológico, colesterol, CaCl2, MgSO4 e tampão KPO4) e alimentados com cultura da bactéria E. coli OP50, cultivada em meio Luria Bertani (LB) overnight. Para garantir a homogeneidade dos ensaios, os animais serão sincronizados no estágio larval L1 por meio de um protocolo alcalino que usa lavagem com solução salina M9 suplementada, seguida de tratamento com solução bleach que elimina adultos e preserva ovos intactos, incubados até a eclosão.

Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A produção de ROS será avaliada utilizando métodos fluorimétricos específicos. Animais de cada cepa mutante e controle serão incubados com sondas fluorescentes que detectam espécies oxidativas, como H2DCF-DA (dicloro-di-hidrofluoresceína diacetato) . Após incubação, a fluorescência será medida por microscopia de fluorescência, usando o software NIH ImageJ 66 versão

1.51 (2011). Os valores obtidos em pixels/área e foram utilizados para confecção de gráficos. (AN E BLACKWELL, 2003; MURPHY et al., 2003)

Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Para quantificar o potencial de membrana mitocondrial nas cepas mutantes exo-3(ok3539) e xpa-1(ok698) de Caenorhabditis elegans, será utilizado o corante sensível ao potencial mitocondrial Tetrametilrhodamina etil éster (TMRE). O TMRE é um corante fluorescente catiônico lipofílico que acumula-se seletivamente nas mitocôndrias ativas em função do gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência intensamente proporcional ao potencial de membrana. Para quantificar o potencial de membrana mitocondrial, será usado o corante TMRE, que se acumula em mitocôndrias ativas, seguindo incubação, lavagem e análise por microscopia de fluorescência e software ImageJ.

Análise da Indução de Apoptose

A apoptose será avaliada em cepas expressando CED-1::GFP (MD701) que marcam células da bainha envolvidas na remoção de células apoptóticas. As cepas mutantes de exo-3 e xpa-1 serão comparadas em condições normais e após exposição a radiação UVC (100 a 280 nm) por 15 minutos, seguida de incubação para permitir ativação do processo apoptótico. A fluorescência nas células será mensurada para quantificar a indução de apoptose, complementando a análise morfológica do sistema nervoso colinérgico nas cepas com marcador unc-17::GFP.

Exposição ao Estresse Oxidativo com H2O2

Para avaliar os efeitos do estresse oxidativo na integridade e viabilidade das cepas mutantes, vermes sincronizados no estágio L1 serão expostos a uma solução de 10 mM de peróxido de hidrogênio (H2O2) por 1 hora. Após a exposição, os animais serão lavados cuidadosamente para remover o excesso do agente oxidante e incubados a 20ºC por 24 horas. Este período permitirá a manifestação dos efeitos do estresse oxidativo, sendo posteriormente avaliados parâmetros como apoptose, função mitocondrial.

Resultados e Discussões

Detecção de ROS

A fim de investigar a possível participação das proteínas EXO-3, XPA-1 e PARP-1 na manutenção da homeostase redox de Caenorhabditis elegans, foi avaliado o estado oxidativo de animais da linhagem selvagem N2 e de linhagens deficientes em exo-3, xpa-1 e parp-1. A avaliação foi realizada por meio de uma sonda fluorescente derivada de diclorofluoresceína, permitindo a comparação da intensidade do sinal oxidativo entre os diferentes genótipos. Essa abordagem é amplamente empregada em C. elegans para a avaliação de alterações no estado oxidativo, embora a fluorescência produzida por essas

sondas não seja específica para uma única espécie reativa de oxigênio (HERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2023).

A análise do estado oxidativo desses mutantes é particularmente relevante devido à relação bidirecional entre espécies reativas de oxigênio e integridade do DNA. O metabolismo celular pode gerar espécies oxidantes capazes de promover modificações em bases nitrogenadas e outras lesões no DNA, enquanto a persistência dessas alterações pode interferir na homeostase celular. O reparo dessas lesões depende da atuação coordenada de diferentes vias de reparo do DNA, incluindo o reparo por excisão de bases (BER) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (LINDAHL; BARNES, 2020; GOHIL; SARKER; ROY, 2023).

No contexto da BER, EXO-3 constitui um componente relevante da maquinaria de reparo de C. elegans. A via BER atua principalmente na correção de lesões que alteram bases individuais ou geram sítios abásicos, incluindo danos provenientes de processos oxidativos. O funcionamento dessa via envolve uma sequência coordenada de eventos de reconhecimento, excisão da lesão, processamento do sítio de reparo e restauração da sequência de DNA (LINDAHL; BARNES, 2020; PAPALUCA et al., 2018). A caracterização molecular da BER em C. elegans demonstra que diferentes enzimas dessa via apresentam funções específicas no processamento de lesões distintas, evidenciando a importância desse mecanismo para a manutenção da integridade genômica do organismo (LINDAHL; BARNES, 2020).

Dessa forma, a deficiência de EXO-3 pode modificar a capacidade celular de lidar com determinados intermediários provenientes do dano ao DNA. Considerando que lesões oxidativas constituem um importante substrato das vias de reparo do DNA, alterações na eficiência desses mecanismos podem estar associadas a modificações na resposta celular ao estresse oxidativo. Entretanto, essa relação não permite estabelecer previamente que animais exo-3 apresentarão necessariamente aumento de ROS. A direção e a magnitude dessa alteração dependem do equilíbrio entre geração de espécies oxidantes, capacidade antioxidante e mecanismos de reparo e resposta ao dano.

Para XPA-1, a relação com o reparo do DNA é estabelecida por sua participação na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Essa via é responsável pelo reconhecimento e remoção de diferentes tipos de lesões que provocam distorções estruturais no DNA. Evidências recentes demonstram que a necessidade de XPA para a NER é conservada entre diferentes espécies, incluindo C. elegans, reforçando a importância dessa proteína para o funcionamento da via de reparo (KOSE et al., 2024).

Além de sua função na NER, XPA-1 já foi associada diretamente à homeostase oxidativa em C. elegans. Fensgard et al. (2013) observaram aumento dos níveis basais de ROS em animais mutantes xpa-1 em comparação à linhagem selvagem. Utilizando H_2-DCF-DA, os autores identificaram aproximadamente 1,3 vez mais ROS nos mutantes xpa-1, acompanhados pelo aumento da expressão de genes associados à resposta antioxidante, incluindo sod-3 e gst-4 (FENSGARD et al., 2013). Esse achado fornece uma base experimental importante para a investigação do estado oxidativo dos animais xpa-1 no presente estudo.

A utilização de uma abordagem semelhante para os diferentes genótipos permite, portanto, avaliar se a deficiência de proteínas envolvidas no reparo do DNA está

associada a alterações no estado oxidativo basal. Caso seja observado aumento da intensidade de fluorescência nos animais xpa-1 em relação ao N2, esse resultado poderá ser comparado diretamente com os achados descritos por Fensgard et al. (2013). Para exo-3 e parp-1, a comparação com N2 permitirá determinar experimentalmente se a perda dessas proteínas também está associada a alterações no sinal oxidativo e se os possíveis fenótipos apresentam magnitude semelhante à observada em xpa-1.

A inclusão de PARP-1 na análise permite ainda investigar uma relação adicional entre reparo do DNA e estado redox. Embora PARP-1 esteja envolvida na resposta celular a danos no DNA, a existência dessa função não é suficiente para predizer a direção de uma eventual alteração nas ROS após sua perda. Assim, o fenótipo observado no mutante parp-1 deverá ser determinado experimentalmente e interpretado em conjunto com os dados obtidos para exo-3, xpa-1 e N2.

A comparação entre os quatro genótipos foi realizada a partir da intensidade de fluorescência detectada nos animais. Um aumento do sinal em determinado mutante em relação à linhagem N2 será compatível com aumento do estado oxidativo detectado pelo método empregado, enquanto uma redução indicará menor sinal oxidativo nas condições experimentais avaliadas. A ausência de diferença significativa, por sua vez, demonstraria que a deficiência do gene analisado não produziu alteração detectável nesse parâmetro. Essas interpretações deverão ser realizadas considerando-se os resultados estatísticos e as condições experimentais utilizadas.

É importante destacar que a intensidade de fluorescência obtida por sondas derivadas de diclorofluoresceína não deve ser interpretada como uma medida direta da concentração de uma única ROS. O sinal obtido representa um indicador de processos oxidativos detectados pela sonda e pode ser influenciado por diferentes fatores celulares e experimentais. Consequentemente, os resultados do presente estudo serão interpretados como diferenças relativas no sinal oxidativo entre os genótipos, e não como uma quantificação absoluta de uma espécie específica de ROS (HERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2023).

Assim, a análise comparativa de N2, exo-3, xpa-1 e parp-1 permitirá avaliar experimentalmente se essas proteínas estão associadas à manutenção do estado oxidativo de C. elegans. A identificação de diferenças entre os genótipos poderá fornecer evidências sobre possíveis conexões entre as vias de reparo do DNA e a homeostase redox, enquanto a ausência de alterações poderá indicar que a perda isolada de determinada proteína não é suficiente para modificar o estado oxidativo detectável nas condições avaliadas. A integração desses resultados com dados previamente descritos na literatura permitirá estabelecer com maior precisão o papel de EXO-3, XPA-1 e PARP-1 na resposta celular ao dano e na manutenção da homeostase em C. elegans.

A análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada a partir da intensidade de fluorescência obtida nos animais C. elegans dos diferentes genótipos, após exposição à sonda DICLORO e posterior submissão a estresse térmico a 37 °C durante 1 hora. Foram avaliados os animais selvagens N2, utilizados como grupo controle, e as linhagens deficientes em EXO-3, XPA-1 e PARP-1.

Nas três réplicas experimentais, foi observado um padrão consistente de aumento da intensidade de fluorescência nos animais deficientes em relação ao grupo N2. Os animais

N2 apresentaram os menores níveis de fluorescência em todas as réplicas, enquanto as linhagens deficientes em exo-3, xpa-1 e parp-1 apresentaram maior intensidade do sinal fluorescente.

Na primeira réplica, a linhagem xpa-1 apresentou a maior intensidade de fluorescência, seguida por parp-1 e exo-3, enquanto os animais N2 apresentaram o menor sinal. Na segunda réplica, foi novamente observado maior sinal no grupo xpa-1, seguido por exo-3 e parp-1, com o grupo N2 apresentando a menor intensidade. Na terceira réplica, os animais deficientes em xpa-1 e parp-1 apresentaram as maiores intensidades de fluorescência, enquanto exo-3 apresentou valor intermediário e N2 permaneceu com o menor sinal.

A análise conjunta das três réplicas evidenciou a manutenção desse padrão, com aumento da intensidade média de fluorescência nos três genótipos deficientes quando comparados ao grupo N2. Entre os mutantes, xpa-1 apresentou a maior intensidade média de fluorescência, seguido por parp-1 e exo-3.

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, considerando os quatro grupos experimentais. As comparações apresentadas nos gráficos indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os animais deficientes em EXO-3, XPA-1 e PARP-1 e o grupo controle N2, conforme indicado pelos asteriscos nos gráficos. Dessa forma, os resultados demonstram que os animais deficientes nos três genes apresentaram maior intensidade de fluorescência associada à sonda utilizada após a exposição ao estresse térmico.

É importante destacar que o presente experimento foi realizado após 1 hora de exposição a 37 °C, portanto, os resultados representam a resposta dos diferentes genótipos a uma condição experimental de estresse térmico. Dessa maneira, os dados não devem ser interpretados apenas como diferenças nos níveis basais de ROS entre as linhagens, mas como diferenças na resposta ao desafio experimental imposto. O aumento da fluorescência observado nos mutantes pode, portanto, refletir tanto maior geração de espécies reativas quanto alterações na capacidade de neutralização ou remoção dessas espécies.

De forma geral, o padrão observado nas três réplicas — N2 apresentando a menor intensidade de fluorescência e os mutantes exo-3, xpa-1 e parp-1 apresentando valores superiores — reforça a associação entre essas proteínas e a manutenção da homeostase celular diante de condições de estresse. O maior sinal observado em xpa-1 sugere ainda que a deficiência dessa proteína pode produzir uma resposta oxidativa particularmente pronunciada nas condições avaliadas.

Assim, os resultados obtidos neste estudo indicam que a deficiência de EXO-3, XPA-1 e PARP-1 está associada a alterações no sinal fluorescente relacionado à presença de espécies reativas em C. elegans submetidos a estresse térmico, sendo XPA-1 o genótipo que apresentou a maior intensidade de fluorescência entre os grupos analisados. Esses achados contribuem para a compreensão da relação entre mecanismos de reparo do DNA e manutenção da homeostase redox, indicando que alterações nessas vias podem influenciar a resposta dos organismos ao estresse celular.

A análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada a partir da intensidade de fluorescência obtida nos animais C. elegans dos diferentes genótipos, após exposição à sonda DICLORO e posterior submissão a estresse térmico a 37 °C durante 1 hora. Foram avaliados os animais selvagens N2, utilizados como grupo controle, e as linhagens deficientes em EXO-3, XPA-1 e PARP-1.

Nas três réplicas experimentais, foi observado um padrão consistente de aumento da intensidade de fluorescência nos animais deficientes em relação ao grupo N2. Os animais N2 apresentaram os menores níveis de fluorescência em todas as réplicas, enquanto as linhagens deficientes em exo-3, xpa-1 e parp-1 apresentaram maior intensidade do sinal fluorescente.

Na primeira réplica, a linhagem xpa-1 apresentou a maior intensidade de fluorescência, seguida por parp-1 e exo-3, enquanto os animais N2 apresentaram o menor sinal. Na segunda réplica, foi novamente observado maior sinal no grupo xpa-1, seguido por exo-3 e parp-1, com o grupo N2 apresentando a menor intensidade. Na terceira réplica, os animais deficientes em xpa-1 e parp-1 apresentaram as maiores intensidades de fluorescência, enquanto exo-3 apresentou valor intermediário e N2 permaneceu com o menor sinal.

A análise conjunta das três réplicas evidenciou a manutenção desse padrão, com aumento da intensidade média de fluorescência nos três genótipos deficientes quando comparados ao grupo N2. Entre os mutantes, xpa-1 apresentou a maior intensidade média de fluorescência, seguido por parp-1 e exo-3.

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, considerando os quatro grupos experimentais. As comparações apresentadas nos gráficos indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os animais deficientes em EXO-3, XPA-1 e PARP-1 e o grupo controle N2, conforme indicado pelos asteriscos nos gráficos. Dessa forma, os resultados demonstram que os animais deficientes nos três genes apresentaram maior intensidade de fluorescência associada à sonda utilizada após a exposição ao estresse térmico.

Apoptose

A deficiência de exo-3 pode induzir a apoptose já está bem descrito que a deficiência das vias de reparo NER e BER induzem um aumento na produção de EROs (CALAND 2021), caracterizando um estresse oxidativo. Uma vez que o estresse oxidativo pode induzir a apoptose, foi avaliado se a deficiência de EXO-3 e XPA-1 induzem apoptose nas células germinativas do C. elegans. Para esta análise a cepa transgênica MD701 que tem o promotor de ced-1, gene presente na via apoptótica, fundido com GFP. Esse gene codifica uma proteína transmembrana semelhante ao SREC humano (receptor Scavenger de células endoteliais) e funciona em células fagocíticas e se aglomera em torno de cadáveres celulares vizinhos (ZHOU; HARTWIEG; HORVITZ, 2001). Esta cepa foi tratada com RNAi para exo-3 e/ou xpa-1 e a quantidade de eventos apoptóticos foi verificada após por 72 e 192 h (Figura 8A). Observando a quantidade de eventos apoptóticos em animais knockdown, não é possível afirmar que a deficiência de exo-3 possa induzir apoptose, entretanto, apesar de não ter significância estatística, é possível Visualizar um aumento de eventos apoptóticos em animais deficientes em exo-3.

(Figura 8B). Animais de 72h deficientes em exo-3 apresentaram uma média de aproximadamente 0,52 eventos apoptóticos por animal, enquanto o grupo deficiente em xpa-1 apresentou uma média de 0,2 e o grupo deficiente em exo-3 e xpa-1 possui uma média de aproximadamente 0,37, o controle teve uma média de 0 eventos apoptóticos. Já os animais de 192h deficientes em exo-3 tiveram uma média de 0,23 eventos apoptóticos, o grupo deficiente em xpa-1 apresentou uma média de 0, enquanto o grupo deficiente em xpa-1 e exo-3 teve uma média de aproximadamente 0,067 e o controle 0,1. Figura 8. Efeito da deficiência de exo-3 na indução da apoptose. (A) Imagens registradas por meio de microscópio de fluorescência de eventos apoptóticos em células da bainha de C. elegans tratados com RNAi para exo-3 e/ou xpa-1 por 72h e 192h. As setas brancas indicam oócitos apoptóticos. (B) Gráfico de dispersão demonstrando o número de eventos apoptóticos por animal. Os animais foram tratados com RNAi para exo-3 e/ou xpa-1 por 72h e 192h, n=60 e n=30 respectivamente. Embora não haja diferença estatística, parece haver uma propensão a maior quantidade de eventos de morte celular em animais deficientes em exo-3.

A apoptose é uma forma de morte celular programada e é uma maneira de limpeza de células danificadas ou disfuncionais. Células deficientes em ERCC1, uma endonuclease que atua na via NER e na correção de ligações cruzadas entre fitas, induz senescência em fibroblastos de camundongos, entretanto, as células deficientes de ERCC1 são mais suscetíveis à apoptose via TNFα secretado por células senescentes vizinhas (KIM et al., 2019). A deficiência de APE1 causa mortalidade embrionária em camundongos e em cultura de células induz apoptose. Células epidérmicas de camundongos deficientes em CSB e XPA exibiram também uma alta taxa de células apoptóticas quando expostas a UV (DE MELO et al., 2016). Neste trabalho, a indução à morte celular foi investigada por meio da quantificação de corpos apoptóticos em animais transgênicos que possui GFP fusionada a CED-1, uma proteína presente em células fagocíticas as quais reconhecem células mortas. Apesar de não ser significativamente estatístico, é possível visualizar uma tendência de animais deficientes em exo-3 a apresentarem um maior número de eventos apoptóticos, sendo ainda mais relevante em animais de 72h.

Potencial de membrana

Ensaios relacionados a potencial de membrana mitocondrial não foram possíveis devido a ausência de um dos reagentes do corante TMRE e do paralisante levamisol.

Conclusão

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a deficiência de proteínas envolvidas no reparo e processamento de danos ao DNA está associada a alterações na homeostase celular de C. elegans. A análise de ROS demonstrou aumento da intensidade de fluorescência nos animais deficientes em EXO-3, XPA-1 e PARP-1 em relação ao controle N2 após exposição ao estresse térmico, com XPA-1 apresentando a maior intensidade de fluorescência, sugerindo maior acúmulo de espécies reativas nas condições avaliadas. Apesar de a análise de apoptose não ter apresentado diferença estatisticamente significativa, foi observada uma tendência de aumento de eventos apoptóticos nos animais deficientes em EXO-3, especialmente nos animais de 72 horas. Dessa forma, os resultados sugerem uma possível relação entre a deficiência das vias de reparo do DNA,

o aumento do desequilíbrio redox e alterações na resposta celular, embora os dados de apoptose não permitam estabelecer uma relação causal direta entre o aumento de ROS e a indução de morte celular nas condições experimentais avaliada.

Referências

Arczevska, K. D. et al. Active transcriptomic and proteomic reprogramming in the C. elegans nucleotide excision repair mutant xpa-1. Nucleic Acids Research, v. 41, n. 10, p. 5368-5381, 2013.

Bezerra, L. S. C. Caracterização das proteínas EXO-3/APE1 e XPA-1/XPA no desenvolvimento de fenótipos neurodegenerativos no Caenorhabditis elegans. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2025.

Cadet, J.; Davies, K. J. A. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. Free Radical Biology and Medicine, v. 107, p. 212, 2017.

Calixto, A. et al. Enhanced neuronal RNAi in C. elegans using SID-1. Nature Methods, v. 7, n. 7, p. 554-559, 2010.

Culetto, E. A role for Caenorhabditis elegans in understanding the function and interactions of human disease genes. Human Molecular Genetics, v. 9, n. 6, p. 869-877, 2000.

Dyrkheeva, N. S.; Lebedeva, N. A.; Lavrik, O. I. AP endonuclease 1 as a key enzyme in repair of apurinic/apyrimidinic sites. Biochemistry (Moscow), v. 81, n. 9, p. 951-967, 2016.

Elsakrmy, N.; Zhang-Akiyama, Q.-M.; Ramotar, D. The Base Excision Repair Pathway in the Nematode Caenorhabditis elegans. Frontiers in Cell and Developmental Biology, v. 8, 2020.

Fang, E. F. et al. Defective Mitophagy in XPA via PARP-1 Hyperactivation and NAD+/SIRT1 Reduction. Cell, v. 157, n. 4, p. 882-896, 2014.

Freudenthal, B. D. Base excision repair of oxidative DNA damage from mechanism to disease. Frontiers in Bioscience, v. 22, n. 9, p. 1493-1522, 2017.

Gupta, S. et al. Crosstalk between Different DNA Repair Pathways Contributes to Neurodegenerative Diseases. Biology, v. 10, n. 2, p. 163, 2021.

Kaletta, T.; Hengartner, M. O. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. Nature Reviews Drug Discovery, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

Kwiatkowski, D. et al. Associations between DNA Damage, DNA Base Excision Repair Gene Variability and Alzheimer's Disease Risk. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, v. 41, n. 3-4, p. 152-171, 2016.

Leandro, G. S.; Sykora, P.; Bohr, V. A. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. Mutation Research, v. 776, p. 31-39, 2015.

Melis, J. P. M.; Van Steeg, H.; Luijten, M. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. Antioxidants & Redox Signaling, v. 18, n. 18, p. 2409-2419, 2013.

Priscyanne Barreto Siqueira et al. The APE1/REF-1 and the hallmarks of cancer. Molecular Biology Reports, v. 51, n. 1, 2024.

Schieber, M.; Chandel, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Current Biology, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. Oxidative Stress. Annual Review of Biochemistry, v. 86, p. 715-748, 2017.

Sulston, J. E.; Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. Developmental Biology, v. 56, n. 1, p. 110-156, 1977.

Tiwari, V. K.; Wilson, D. M. 3rd. DNA Damage and Repair in Neurodegeneration. Progress in Molecular Biology and Translational Science, v. 163, p. 1-55, 2019.

FENSGARD, A. et al. Active transcriptomic and proteomic reprogramming in the C. elegans nucleotide excision repair mutant xpa-1. Nucleic Acids Research, v. 41, n. 10, p. 5368–5383, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt225.

GOHIL, D.; SARKER, A. H.; ROY, R. Base excision repair: mechanisms and impact in biology, disease, and medicine. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 18, p. 14186, 2023. DOI: 10.3390/ijms241814186.

HERNÁNDEZ-CRUZ, E. Y.; EUGENIO-PÉREZ, D.; RAMÍREZ-MAGAÑA, K. J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Effects of vegetal extracts and metabolites against oxidative stress and associated diseases: studies in Caenorhabditis elegans. ACS Omega, v. 8, n. 10, p. 8936–8959, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.2c07025.

KOSE, C. et al. Cross-species investigation into the requirement of XPA for nucleotide excision repair. Nucleic Acids Research, v. 52, n. 2, p. 677–689, 2024. DOI: 10.1093/nar/gkad1104.

LINDAHL, T.; BARNES, D. E. The base excision repair pathway in the nematode Caenorhabditis elegans. Genes, v. 11, n. 11, 1272, 2020. DOI: 10.3390/genes11111272.

PAPALUCA, A.; WAGNER, J. R.; SARAGOVI, H. U.; RAMOTAR, D. UNG-1 and APN-1 are the major enzymes to efficiently repair 5-hydroxymethyluracil DNA lesions in C. elegans. Scientific Reports, v. 8, 6860, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25124-1.

Anexos



Gráfico ROS



Figura 8B

CÓDIGO: SB0768

AUTOR: LIHEBE FREIRE MAIA

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Proposta de modelo invertebrado alternativo para estudos de obesidade: efeitos de Polissacarídeos Sulfatados de algas em Tenebrio molitor

Resumo

A obesidade é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença crônica e recorrente, associada ao desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Embora o desenvolvimento de fármacos antiobesidade tenha avançado no último século, existem limitações relacionadas à segurança e aos efeitos adversos que reforçam a necessidade de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram o potencial antiobesidade de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados (PS) da macroalga marinha Caulerpa sertularioides em modelos in vitro. Entretanto, seus efeitos ainda não foram investigados in vivo. Em concordância com os princípios dos 3Rs, que orientam a substituição e redução do uso de animais em pesquisa, a larva de Tenebrio molitor apresenta potencial como modelo experimental alternativo para estudos relacionados à obesidade. Assim, este estudo teve como objetivo padronizar um modelo in vivo com larvas de T. molitor para avaliar potenciais efeitos antiadipogênicos. As larvas foram submetidas a uma dieta hipercalórica, constituída por substrato suplementado com 15% de glicose, e comparadas a animais mantidos em dieta controlada. Os resultados preliminares demonstraram um aumento significativo no percentual de gordura das larvas submetidas à dieta hipercalórica. Esses achados indicam que T. molitor apresenta potencial para o desenvolvimento de um modelo vivo.

Palavras-chave: Doença. Obesidade. Hipercalórica. Gordura

TITLE: Proposal of an Alternative Invertebrate Model for Obesity Studies: Effects of Algal Sulfated Polysaccharides in Tenebrio molitor

Abstract

Obesity is classified by the World Health Organization (WHO) as a chronic and recurrent disease associated with conditions such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, and certain types of cancer. Although anti-obesity drug development has advanced, limitations related to safety and adverse effects reinforce the need for new therapeutic alternatives. Previous studies by our research group demonstrated the anti-obesity potential of sulfated polysaccharide (SP)-rich samples

from the marine macroalga Caulerpa sertularioides in in vitro models; however, their effects in vivo remain unexplored. In accordance with the principles of the 3Rs, Tenebrio molitor larvae have potential as an alternative experimental model for obesity-related studies. Thus, this study aimed to standardize an in vivo model using T. molitor larvae to evaluate potential anti-adipogenic effects. Larvae were subjected to a hypercaloric diet consisting of a substrate supplemented with 15% glucose and compared with animals maintained on a control diet. Preliminary results demonstrated a significant increase in body fat percentage in larvae exposed to the hypercaloric diet. These findings indicate that T. molitor has potential as an in vivo model for investigating compounds with anti-obesity activity, including algal SPs.

Keywords: Disease. Obesity. Hypercaloric diet. Body fat.

Introdução

A obesidade é uma doença metabólica crônica e multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo e associada ao aumento do risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis, incluindo diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e determinados tipos de câncer (GJERMENI et al., 2025). Em 2022, mais de 1 bilhão de indivíduos apresentavam obesidade, dos quais aproximadamente 159 milhões eram crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos, evidenciando a crescente magnitude desse problema de saúde pública (WORLD OBESITY FEDERATION, 2024). Sua fisiopatologia envolve a interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais, ambientais e socioeconômicos. Entre os fatores ambientais, destaca-se o ambiente obesogênico, caracterizado por condições que favorecem o consumo energético excessivo e a redução do gasto energético, incluindo a ampla disponibilidade de alimentos ultraprocessados, geralmente caracterizados por elevada densidade energética e alta palatabilidade (MASOOD; MOORTHY et al., 2023).

O tratamento da obesidade envolve intervenções nutricionais e comportamentais, terapias farmacológicas e, em casos específicos, procedimentos cirúrgicos. Nas últimas décadas, houve avanços expressivos na farmacologia antiobesidade, incluindo o desenvolvimento de agonistas dos receptores de GLP-1 e de terapias que atuam conjuntamente nas vias de GLP-1 e GIP, capazes de promover redução significativa do peso corporal (MOREIRA et al., 2024). Entretanto, limitações relacionadas à segurança, tolerabilidade e ocorrência de eventos adversos reforçam a necessidade de investigar novas alternativas terapêuticas com eficácia sustentada e perfil de segurança adequado (ARONNE et al., 2025; CHAO et al., 2020).

Nesse contexto, os polissacarídeos sulfatados (PSs) provenientes de algas marinhas destacam-se como fontes promissoras de compostos bioativos. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram atividade antiadipogênica de PSs obtidos das algas verdes Caulerpa prolifera e C. sertularioides em células 3T3-L1, evidenciando seu potencial de modulação do processo adipogênico (CHAVES FILHO et al., 2020; 2022). Entretanto, embora modelos celulares sejam importantes para a investigação de mecanismos moleculares, sua capacidade de reproduzir a complexidade metabólica de organismos multicelulares é limitada. Dessa forma, a avaliação em modelos in vivo constitui uma etapa relevante para a continuidade dessas investigações. Corroborando esse potencial,

fucoidanas, uma classe de PSs ricos em fucose, demonstraram atividade antiadipogênica em camundongos submetidos à dieta rica em gordura (LEE et al., 2020).

Considerando os princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction e Refinement), a utilização de modelos invertebrados pode contribuir para a redução do uso de vertebrados nas etapas iniciais da investigação experimental. Nesse contexto, a larva de Tenebrio molitor apresenta características favoráveis à sua utilização como modelo experimental, incluindo facilidade de manutenção, baixo custo e ciclo de vida relativamente curto (CORREA et al., 2023). Além disso, suas larvas apresentam elevado teor proteico e aproximadamente 34,5% de gordura, características que sustentam seu potencial para estudar o metabolismo lipídico (HACHERO-CRUZADO et al., 2024). Apesar de sua ampla utilização como fonte alternativa de proteína na alimentação animal (MORUZZO et al., 2021), sua aplicação como modelo in vivo para investigação de agentes com potencial antiobesidade permanece pouco explorada. Assim, o presente estudo teve como objetivo padronizar as condições experimentais para estabelecer um modelo de larvas de T. molitor submetidas à dieta hipercalórica, visando sua aplicação na avaliação in vivo de compostos com potencial atividade antiobesidade.

Metodologia

3.1- Manutenção das larvas do Tenébrio molitor

As larvas foram mantidas numa dieta padrão constituída por 36,36% de farelo de trigo, 18,18% de germe de trigo, 18,18% de farinha de trigo, 16,36% de aveia em flocos, 10,9% de extrato de soja e 0,04% de cloranfenicol (SOUZA et al., 2015). Para os testes, foram selecionadas 24 larvas, divididas em 2 grupos de 12 larvas: 1) controle negativo, ou seja, larvas alimentadas somente com o substrato e 2) o grupo teste que foi mantido numa dieta hipercalórica contendo glicose a 20%. Além disso, os grupos analisados também foram utilizados para observar o comportamento das larvas de acordo com cada dieta a que elas foram submetidas. Os estudos foram realizados em placas de 6 poços, colocando uma larva em cada poço, com peso inicial entre 20 e 30 mg. O substrato de todos os grupos foi trocado a cada 2 dias. A massa da larva também foi avaliada a cada 2 dias, durante 15 dias.

3.2 - Obtenção do corpo gorduroso

Ao final do experimento, as larvas foram dissecadas para obtenção do corpo gorduroso. De forma resumida, essa dissecação ocorreu da seguinte forma: foram removidos a cabeça, a extremidade caudal, o intestino e a cutícula da larva, restando apenas o corpo gorduroso que foi emulsificado em uma solução tampão de fosfato salino (PBS) contendo 0,5% de Tween 20. A amostra foi então centrifugada primeiramente a 3.000 rpm, por 10 min e o sobrenadante resultante foi centrifugado, novamente, a 10.000 rpm por 10 min. Todo o processamento das amostras foi realizado em temperaturas baixas (4 °C) para evitar a degradação das mesmas. Por fim, a amostra foi sonicada, com o intuito de homogeneizar os lipídeos antes da quantificação. Uma parte da amostra foi submetida a 70 °C, durante 10 min, para inativação das lipases e a outra parte foi usada

para quantificar as proteínas totais. No caso de quantificações realizadas em outro dia, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

3.3 - Quantificação de triglicerídeos das larvas do Tenebrio molitor

A quantificação dos triglicerídeos foi realizada utilizando o kit comercial Labtest (Triglicérides Liquiform), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras, depois de sonicadas e submetidas à inativação das lipases, foram colocadas (2,5 µL) em uma placa de 96 poços e foi adicionado o reagente (250 µL). Foi utilizado o padrão da curva fornecido no kit, adaptado para volumes menores. O ensaio foi realizado em triplicata. A placa foi incubada por 10 min e a absorbância foi lida a 505 nm.

3.4- Quantificação de proteínas das larvas do Tenebrio molitor.

As proteínas foram quantificadas pelo método do BCA (Pierce™), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, em uma placa de 96 poços foram usados 25 µL da amostra e 200 µL do reagente preparado de acordo com as recomendações do kit. A curva padrão foi construída utilizando diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA). Água ultrapura foi utilizada como o branco da curva e o branco da amostra foi o tampão. As amostras dos padrões foram incubadas com o reagente por 30 min, a 37 °C. A densidade óptica foi lida a 562 nm.

3.5- Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. Para cada grupo experimental (dieta padrão e glicose 20%) foram calculadas as médias e o desvio padrão. Foi possível perceber a presença de valores discrepantes (outliers). Esses valores foram avaliados quanto à sua influência nos resultados, sendo apresentadas as análises com e sem esses valores. A comparação entre os dois grupos foi realizada por meio do teste t de Student para amostras independentes, adotando nível de significância de 5% ($P > 0,05$), sendo os valores de p acima desse limite interpretados como significativos. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM).

Resultados e Discussões

Com o objetivo de verificar a manutenção dos resultados obtidos anteriormente e confirmar a resposta das larvas de Tenebrio molitor à suplementação de glicose antes do início dos ensaios com as amostras experimentais, foi realizado um ensaio de confirmação utilizando o mesmo protocolo experimental previamente estabelecido. Foram utilizadas inicialmente 18 larvas de T. molitor, sendo nove destinadas ao grupo controle, mantidas em dieta padrão, e nove submetidas à dieta hipercalórica, suplementada com 20% de glicose.

As larvas utilizadas no presente ensaio foram fornecidas pelo grupo de pesquisa da professora Raquel Theodoro do Laboratório de Micologia Médica (LAMIM) e apresentavam tamanho e peso dentro do padrão estabelecido no momento da coleta. Entretanto, durante o acompanhamento experimental, foram observadas alterações no comportamento e no desenvolvimento dos animais, caracterizadas por menor atividade, menor eficiência alimentar e progressão mais rápida para o estágio de pupa. Essas alterações foram observadas em ambos os grupos experimentais e foram acompanhadas pela perda de indivíduos ao longo do período experimental. Ao final dos 15 dias, permaneceram apenas cinco larvas no grupo controle e quatro no grupo suplementado com 20% de glicose.

Vale destacar que características semelhantes também foram observadas em experimentos conduzidos pelo grupo da professora Raquel utilizando a mesma população de T. molitor, embora com objetivo experimental distinto. Dessa forma, o comportamento observado não se restringiu ao protocolo utilizado neste estudo ou à suplementação com glicose. Considerando que os animais apresentavam tamanho e peso adequados no momento da coleta, as alterações observadas podem estar relacionadas às condições fisiológicas dos próprios animais ou a fatores anteriores ao início do ensaio, cuja influência não pode ser determinada no estudo.

Na avaliação do peso corporal ao final dos 15 dias (Figura 1), as larvas mantidas em dieta padrão apresentaram valores entre 29 e 33 mg, enquanto aquelas submetidas à dieta hipercalórica apresentaram valores entre 26 e 36 mg. Em comparação com os resultados obtidos anteriormente, nos quais foi observada uma tendência de maior ganho de massa corporal no grupo submetido à dieta suplementada com 20% de glicose, o presente ensaio apresentou maior sobreposição entre os grupos, não sendo observada uma tendência significativa de aumento de peso associada à suplementação com glicose.

Na quantificação de triglicerídeos (Figura 2), as larvas do grupo controle apresentaram valores entre 1,50 e 2,17 mg/mL, enquanto o grupo suplementado com 20% de glicose apresentou valores entre 1,68 e 2,94 mg/mL. Embora o maior valor tenha sido observado no grupo hipercalórico, os resultados foram semelhantes entre si, com tendência a maiores níveis de triglicerídeos no grupo suplementado com glicose. No presente ensaio, essa tendência permaneceu parcialmente observável, porém com menor consistência entre os indivíduos.

Na análise da razão entre triglicerídeos e proteínas (Figura 3), o grupo controle apresentou valores entre 0,67 e 1,23, enquanto o grupo submetido à dieta hipercalórica apresentou valores entre 0,74 e 4,50. O maior valor observado no grupo hipercalórico esteve associado a uma concentração proteica consideravelmente inferior à observada nos demais indivíduos desse grupo, resultando em uma razão elevada. Dessa maneira, embora o valor tenha sido mantido na representação gráfica por corresponder a um resultado obtido experimentalmente, ele foi interpretado com cautela e não foi utilizado isoladamente para caracterizar maior acúmulo de triglicerídeos.

No geral, os resultados obtidos neste ensaio apresentaram diferenças em relação ao padrão observado nos experimentos anteriores. Nos ensaios previamente realizados, os resultados foram reproduzidos de maneira semelhante em uma duplicata experimental conduzida com 24 animais, reforçando a consistência do padrão inicial observado, caracterizado por uma tendência de maior peso corporal e maiores níveis de

triglicerídeos no grupo com dieta suplementada. No presente ensaio, entretanto, essa tendência não foi reproduzida de forma significativa, especialmente para o peso corporal, que apresentou maior sobreposição entre os grupos.

Dessa forma, os resultados obtidos neste ensaio não confirmaram os resultados anteriores. Apesar de alguns parâmetros, especialmente os triglicerídeos, ainda apresentarem valores mais elevados no grupo suplementado com glicose, o conjunto dos resultados não reproduziu integralmente as tendências observadas nos ensaios anteriores.

Conclusão

O presente estudo teve como objetivo consolidar os resultados previamente obtidos com Tenébrio molitor submetido à dieta suplementada com 20% de glicose, antes do início das análises com as amostras experimentais, no caso, os PS de macroalgas marinhas. Contudo, os resultados não reproduziram integralmente o padrão observado nos experimentos anteriores, nos quais a suplementação com 20% de glicose esteve associada a tendências de maior peso corporal e maiores níveis de triglicerídeos.

No entanto, vale ressaltar que durante o experimento, foram registradas menor atividade, menor eficiência alimentar e progressão acelerada para o estágio de pupa em ambos os grupos, acompanhadas da perda de indivíduos. Comportamentos semelhantes foram observados em outros experimentos usando a mesma população de T. molitor, sugerindo a possibilidade de influência de características fisiológicas ou de condições anteriores ao início do ensaio. Assim, os estudos devem prosseguir com nova população de animais para que a validação do modelo possa ser otimizada..

Referências

ARONNE, Louis J.; HORN, Deborah Bade; ROUX, Carel W. Le; HO, Wayne; FALCON, Beverly L.; VALDERAS, Elisa Gomez; DAS, Sagar; LEE, Clare J.; GLASS, Leonard C.; SENYUCEL, Cagri. Tirzepatide as Compared with Semaglutide for the Treatment of Obesity: 1. New England Journal Of Medicine, Massachusetts. 2025. Massachusetts Medical Society.

http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2416394

BRAI, Annalaura; POGGIALINI, Federica; VAGAGGINI, Chiara; PASQUALINI, Claudia; SIMONI, Sauro; FRANCARDI, Valeria; DREASSI, Elena. Tenebrio molitor as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 2296, 24 jan. 2023. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032296.

BURCH, Rex L.. The Progress of Humane Experimental Technique since 1959: a personal view. Alternatives To Laboratory Animals, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 776-783, nov. 1995. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/026119299502300607

CHAO, Ariana M.; WADDEN, Thomas A.; BERKOWITZ, Robert I.; QUIGLEY, Kerry; SILVESTRY, Frank. The risk of cardiovascular complications with current obesity drugs: 2. Expert Opinion On Drug Safety, v. 19, n. 9, p. 1095-1104, 1 set. 2020. Informa UK Limited.

http://dx.doi.org/10.1080/14740338.2020.1806234.

CHAVES FILHO, Gildacio; BATISTA, Lucas; MEDEIROS, Silvia de; ROCHA, Hugo; MOREIRA, Susana. Sulfated Glucan from the Green Seaweed Caulerpa sertularioides Inhibits Adipogenesis through Suppression of Adipogenic and Lipogenic Key Factors. Marine Drugs, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 470, 23 jul. 2022. MDPI AG.

http://dx.doi.org/10.3390/md20080470.

CHAVES FILHO, Gildácio Pereira; OLIVEIRA, Riva de Paula; MEDEIROS, Silvia Regina Batistuzzo de; ROCHA, Hugo Alexandre Oliveira; MOREIRA, Susana Margarida Gomes. Sulfated polysaccharides from green seaweed Caulerpa prolifera suppress fat accumulation. Journal Of Applied Phycology, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 4299-4307, 15 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10811-020-02249-3.

CORREA, Clynton Lourenço; GOMES, Carlos Augusto Borges de Andrade; MELLO, Andressa de Abreu; NOGUEIRA, Nathany da Silva; MEDEIROS, Taiane Barreto; BARROS, Cintia Monteiro de; ALLODI, Silvana. Use of invertebrates to model chemically induced parkinsonism-symptoms. Biochemical Society Transactions, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 435-445, 16 jan. 2023. Portland Press Ltd.. http://dx.doi.org/10.1042/bst20221172

FACTOR, Ncd Risk. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adolescents during 1990–2022 and projections to 2035: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. The Lancet, Londres, v. 403, n. 10429, p. 789-791, mar. 2024. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(23)02758-7

GJERMENI, Erind; FIEBIGER, Raluca; BUNDALIAN, Lineu; GARTEN, Antje; SCHONEBERG, Torsten; LE DUC, Diana; BLUHER, Matthias. The impacto of dietary interventions on cardiometanbolic health. Cardiovascular Diabetology, 2025

https://doi.org/10.1186/s12933-025-02766-w

HACHERO-CRUZADO, Ismael; BETANCOR, Mónica B.; CORONEL-DOMINGUEZ, Antonio Jesús; MANCHADO, Manuel; ALARCÓN-LÓPEZ, Francisco Javier. Assessment of Full-Fat Tenebrio molitor as Feed Ingredient for Solea senegalensis: effects on growth performance and lipid profile. Animals, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 595, 11 fev. 2024. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ani14040595.

LEE, Hyo-Geun; JAYAWARDENA, Thilina U.; SONG, Kyung-Mo; CHOI, Yun-Sang; JEON, You-Jin; KANG, Min-Cheol. Dietary fucoidan from a brown marine algae (Ecklonia cava) attenuates lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 cells and alleviates high-fat diet-induced obesity in mice. Food And Chemical Toxicology, [S.L.], v. 162, p. 112862, abr. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2022.112862.

MOREIRA, Rodrigo O. et al. Tratamento farmacológico do indivíduo adulto com obesidade e seu impacto nas comorbidades: atualização 2024 e posicionamento de especialistas da Abeso e da SBEM. São Paulo: Editora Clannad, 2024.

MORUZZO, Roberta; RICCIOLI, Francesco; DIAZ, Salomon Espinosa; SECCI, Chiara; POLI, Giulio; MANCINI, Simone. Mealworm (Tenebrio molitor): potential and challenges to promote circular economy. Animals, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 2568, 31 ago. 2021. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ani11092568.

MASOOD, Beenish; MOORTHY, Myuri. Causes of obesity: a review. Clinical Medicine, Londres, v. 23, n. 4, p. 284-291, jul. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.7861/clinmed.2023-0168.

WORLD OBESITY FEDERATION. World Obesity Atlas 2024. Londres: World Obesity Federation, 2024.

Anexos



Figura 2: Concentração de triglicerídeos nas larvas de Tenebrio molitor mantidas em dieta padrão ou dieta hipercalórica com 20% de glicose, ao final de 15 dias.



Figura 3: Quantificação de Triglicerídeos (TG) normalizados pela concentração de proteína total nas larvas de Tenebrio molitor mantidas em dieta padrão ou suplementada com 20% de glicose, ao longo de 15 dias de experimento.



Figura 1: Peso corporal das larvas de Tenebrio molitor mantidas em dieta padrão ou dieta suplementada com 20% de glicose, ao final de 15 dias.

CÓDIGO: SB0788

AUTOR: CECILIA CERQUEIRA SOUZA

ORIENTADOR: PEDRO PAULO DE ANDRADE SANTOS

TÍTULO: Análise histopatológica do front de invasão e prognóstico dos carcinomas epidermoides de língua quimicamente induzidos em ratos.

Resumo

O carcinoma epidermóide é o sétimo câncer mais comum no mundo, com uma incidência anual de aproximadamente 700.000 casos e uma taxa de mortalidade estimada em 350.000 em 2018 (MACHIELS, J.-P. et al., 2020). O entendimento do processo de desenvolvimento do câncer oral, em especial do carcinoma epidermóide de língua, que é o mais prevalente nessa região anatômica, possui fundamental importância no que diz respeito à investigação dos aspectos relacionados à progressão e ao prognóstico dessas lesões. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar a análise histopatológica e histomorfométrica dos carcinomas epidermóides de língua, com ênfase na avaliação do padrão de invasão presente no front invasivo e sua relação com a profundidade de invasão tumoral. Sendo assim, foi realizado um estudo utilizando ratos da linhagem Wistar, os quais foram submetidos à indução química da carcinogênese oral, com posterior análise histopatológica das alterações neoplásicas desenvolvidas na língua e avaliação histomorfométrica do front de invasão. Os achados do presente estudo revelaram que a prevalência do padrão de células isoladas no front invasivo e o amplo comprometimento dos tecidos vizinhos, demonstrando o elevado potencial de disseminação e destruição local das lesões induzidas quimicamente.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermóide. Histopatologia. Língua. Câncer

TITLE: Clinical-pathological and morphometric analysis of chemically induced oral carcinogenesis in rats

Abstract

Squamous cell carcinoma is the seventh most common cancer worldwide, with an annual incidence of approximately 700,000 cases and an estimated 350,000 deaths in 2018 (MACHIELS, J.-P. et al., 2020). Understanding the development of oral cancer—particularly squamous cell carcinoma of the tongue, the most prevalent type in this anatomical region—is crucial for investigating aspects related to the progression and prognosis of these lesions. Therefore, this study aimed to conduct a histopathological and histomorphometric analysis of squamous cell carcinomas of the tongue, focusing on the invasion pattern at the invasive front and its relationship with the depth of tumor

invasion. A study was conducted using Wistar rats subjected to chemical induction of oral carcinogenesis, followed by histopathological analysis of the neoplastic changes in the tongue and histomorphometric evaluation of the invasive front. The findings revealed a prevalence of the isolated-cell pattern at the invasive front and extensive involvement of surrounding tissues, demonstrating the high potential for local spread and tissue destruction associated with these chemically induced lesions.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Histopathology. Tongue. Cancer

Introdução

No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte por doença, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Considerando a cavidade oral como uma das principais localizações do câncer, foram estimados 11.180 casos em homens e 4.010 em mulheres no Brasil em 2021. Em 2018, houve 1.975 casos de óbitos por carcinoma epidermóide em língua, onde 77% dos casos ocorreram em homens (DA SILVA SOUTO et al, 2023). O carcinoma epidermóide oral (CEO) tem origem nos tecidos epiteliais e os locais mais acometidos são borda lateral de língua, lábio inferior e assoalho oral. Entretanto, qualquer superfície oral pode ser afetada. Considerada uma doença predominantemente do sexo masculino, atinge principalmente indivíduos acima dos 45 anos de idade e leucodermas (NEVILLE et al, 2009). O carcinoma epidermóide de língua é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, com evidências recentes sugerindo aumento da incidência em pacientes mais jovens. As taxas estimadas de sobrevida familiar em 5 e 10 anos são de 65,8% e 57,6%, respectivamente (DANG et al, 2023). Frente à importância do entendimento do processo de carcinogênese oral, objetivando contribuir na melhoria das condições de tratamento e prognóstico dos pacientes acometidos por esta enfermidade. O entendimento do processo de desenvolvimento do câncer oral, em especial do carcinoma epidermóide de língua, que é o mais prevalente nessa região anatômica, possui fundamental importância, haja vista que a análise do front de invasão neoplásico, por si só, está relacionada ao prognóstico. Sabe-se, ainda, que a análise da profundidade de invasão tumoral também apresenta papel importante no prognóstico. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar a análise histopatológica dos carcinomas epidermóides de língua, com ênfase no padrão presente no front invasivo dessas lesões, correlacionando-o com a profundidade de invasão por meio da histomorfometria de carcinomas epidermóides quimicamente induzidos em ratos.

Metodologia

METODOLOGIA 2.1.Caracterização do Estudo Esta pesquisa consistiu em uma análise clínica descritiva e comparativa dos carcinomas epidermóides orais de língua, quimicamente induzidos pelo 4-NQO em ratos, realizando, ainda, a mensuração de sua extensão por meio da morfometria. O protocolo experimental foi submetido à análise da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). 2.2. Amostra A amostra foi constituída por 50 ratos Wistar machos adultos, sendo 10 ratos constituídos no grupo controle (GC) e 40 ratos no grupo experimental, por um período máximo de 37 semanas. O peso dos animais variou entre 200 e 250 g, sendo estes provenientes do Biotério do Centro de Biociências da

Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, contendo de 3 a 4 animais por gaiola, e submetidos a condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro), recebendo ração e água ad libitum. O peso de cada animal foi aferido a cada 7 dias, enquanto o consumo de água e ração por gaiola foi averiguado diariamente ao longo das 37 semanas experimentais. Nesse grupo, o agente carcinógeno 4-NQO foi diluído na água presente no bebedouro (SUPSAVHAD et al., 2016). Após esse período, os animais foram sacrificados por meio de injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina a 5% e xilazina a 2% (0,3 mL/100 g). As lesões da cavidade oral foram devidamente coletadas, fotografadas para a análise macroscópica, medidas e imersas em formaldeído a 10%, para posterior inclusão em parafina e corte em micrótomo, destinados à análise histopatológica e histomorfométrica. 2.3. Análise histopatológica As lâminas obtidas foram analisadas por meio de microscopia óptica (Microscópio OPTIKA-Italy) e fotografadas utilizando um sistema de captura de imagens com câmera acoplada, também da marca OPTIKA-Italy, para a análise criteriosa dos padrões histopatológicos do front de invasão, assim como para a mensuração da profundidade de invasão neoplásica. A análise histopatológica foi realizada após a confirmação da presença do carcinoma epidermóide de língua, com posterior análise do front de invasão tumoral e análise histomorfométrica, com mensuração da profundidade de invasão tumoral. Os parâmetros analisados foram: modo de invasão tumoral (mal definido ou bem definido), padrão histopatológico de invasão (ninhos ou ilhas, cordões, células isoladas e ninhos e cordões), invasão perivascular, invasão perineural, invasão glandular e invasão muscular. 2.4. Análise Estatística Para a análise estatística, os dados coletados serão inicialmente armazenados em planilha específica do Excel (Microsoft Windows) e transportados para o programa estatístico SPSS 20.0 (IBM), onde inicialmente utilizaremos o teste de Kolmogorov-Smirnoff para verificar a normalidade ou não dos dados obtidos. Casos os dados sejam não paramétricos utilizaremos o teste de Kruskal-Wallis (KW), em caso de dados paramétricos, utilizaremos o teste ANOVA (F) e para a verificação de possíveis correlações utilizaremos o teste de correlação de Spearman. 2.5. Implicações Éticas O presente trabalho pertenceu ao projeto aprovado no Edital Universal do CNPq 2021 (nº 409414/2021-2), intitulado “Estudo clínico patológico e imunohistoquímico da evolução de carcinomas epidermóides orais induzidos quimicamente em ratos”, o qual foi submetido à apreciação de seu conteúdo e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), recebendo o número 051/2022.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS 3.1. Caracterização do padrão de invasão 3.1.1. Modo de invasão Foram analisadas um total de 44 amostras, das quais em 26 (59,1%) houve predominância do modo de invasão bem definido (Figura 1), enquanto o padrão mal definido foi identificado em 18 dos casos (40,9%).
3.1.2. Padrão histológico de invasão Em relação a análise do padrão histopatológico de invasão do carcinoma (figura 2), houve maior frequência de células isoladas (n=21), representando 47,7%. Em seguida, observou-se ninhos ou ilhas em 27,3% (n=12), cordões em 15,9% (n=7) e a associação entre ninhos e cordões em 9,1% dos casos (n=4).

3.2. Invasão de estruturas e tecidos adjacentes 3.2.1. Invasão perivascular A invasão perivascular (figura 3) esteve presente em 42 dos 44 casos analisados (95,5%), enquanto esteve ausente em apenas 2 casos (4,5%).
3.2.1. Invasão perineural A invasão perineural (figura 4) foi identificada em 30 casos (68,2%), enquanto 14 casos (31,8%) não apresentaram esse achado.
3.2.3. Invasão glandular e ductal: Na avaliação da invasão glandular (figura 5), 40 casos (90,9%) apresentaram algum grau de comprometimento glandular, sendo 6 casos (13,6%) com invasão da porção ductal, 22 (50,0%) com invasão da porção secretora e 12 (27,3%) com invasão simultânea das porções ductal e secretora. A ausência de invasão glandular foi observada em 4 casos (9,1%).
3.2.4. Invasão muscular: A invasão muscular (figura 6) esteve presente em 42 casos (95,5%), sendo observada ausência desse achado em apenas 2 casos (4,5%).
3.3. Associação entre o padrão de invasão e os parâmetros histopatológicos Foi realizado o teste de normalidade dos dados, apresentado na Figura 7, que demonstrou distribuição não normal das variáveis analisadas. Em seguida, a Figura 8 apresenta os ranks obtidos para os grupos avaliados. Por fim, os resultados do teste estatístico, apresentados na Figura 9, demonstraram que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o padrão de invasão e os parâmetros histopatológicos analisados. Foram obtidos valores de p de 0,369 para o padrão histológico, 0,234 para a invasão perivascular, 0,636 para a invasão perineural, 0,569 para a invasão glandular e 0,234 para a invasão muscular. Dessa forma, na amostra avaliada, não foi identificada associação estatisticamente significativa entre o padrão de invasão e os parâmetros histopatológicos analisados.
4. DISCUSSÃO O carcinoma espinocelular oral (CECO) representa mais de 90% dos casos de neoplasias malignas da cavidade oral e constitui um relevante problema de saúde pública (BADWELAN M et al., 2023). As regiões mais comuns da cavidade oral que podem ser acometidos pelo carcinoma epidermóide são o assoalho de boca e a língua, sendo esta a de maior prevalência (STEPAN, Katelyn O. et al., 2023). Nesse estudo foram analisados os diferentes padrões de comportamento do front de invasão do carcinoma epidermóide em língua, bem como também às invasões aos tecidos adjacentes. Os carcinomas espinocelulares bem diferenciados apresentam maior preservação das características escamosas, com formação de estruturas aninhadas, sólidas ou cordonais, queratinização e presença de pontes intercelulares, além de baixas taxas mitóticas. Os tumores pouco diferenciados apresentam mínima ou ausência de diferenciação escamosa, maior atipia celular e elevada atividade mitótica. (MATSUO K et al., 2022). Nesse contexto, a predominância de células isoladas observada no estudo pode estar relacionada a um padrão de invasão mais dissociado e à menor diferenciação celular, características associadas a maior agressividade tumoral. Essa relação também pode ser encontrada nos achados de Selvaraj et al. (2023), que demonstraram a importância das características do front invasivo, incluindo a dissociação das células tumorais, na avaliação do comportamento do carcinoma espinocelular oral. Assim, a alta frequência de células isoladas identificada neste estudo reforça a presença de um padrão invasivo caracterizado pela perda de adesão entre as células tumorais, podendo representar uma característica relevante para a progressão dessas neoplasias. Neste estudo, a invasão muscular foi observada em 95,5% dos casos, enquanto a invasão perineural esteve presente em 68,2%. Esses achados apresentam frequências superiores às descritas por Ilie et al. (2024), que identificaram invasão muscular em 70% e invasão perineural em 38% dos carcinomas espinocelulares orais avaliados. Os autores também observaram maior ocorrência desses padrões invasivos em tumores localizados na língua, evidenciando a relação entre esse sítio anatômico e o comportamento invasivo

tumoral. Nesse sentido, a elevada frequência de invasão muscular e perineural pode estar relacionada à localização exclusivamente lingual dos carcinomas analisados. Nesta pesquisa, a invasão glandular foi observada em 90,9% das amostras analisadas. Em comparação ao estudo de Bhola et al. (2023), a infiltração de células neoplásicas no tecido glandular esteve presente em 37% dos casos, evidenciando uma frequência expressivamente maior que o presente estudo. Essa elevada taxa de infiltração nas glândulas não se apresentou como um achado isolado, a medida em que o comportamento invasivo e agressivo também esteve presente no tecido muscular, perineural e perivascular. A análise dos parâmetros histopatológicos demonstra um padrão de invasão caracterizado pela alta disseminação e perda de coesão celular, refletida na predominância de células isoladas. O comprometimento das estruturas anatômicas adjacentes evidencia a alta capacidade invasiva do carcinoma epidermóide de língua. Dessa forma, os resultados desta pesquisa contribuem para um melhor entendimento do comportamento biológico dessas neoplasias, ressaltando a importância da avaliação criteriosa e conhecimento das características do front de invasão.

Conclusão

CONCLUSÃO Conclui-se que os carcinomas epidermóides de língua induzidos quimicamente apresentam um comportamento biológico altamente agressivo, caracterizado pela predominância de células isoladas no front de invasão. Além disso, foi possível observar um intenso comprometimento das estruturas adjacentes, com altas taxas de invasão muscular e perivascular, seguidas por elevada infiltração glandular e perineural. Esses achados demonstram o alto potencial destrutivo e infiltrativo do modelo experimental utilizado.

Referências

REFERÊNCIAS BADWELAN, Mohammed et al. Carcinoma de células escamosas oral e tumores primários concomitantes: o que sabemos? Uma revisão da literatura. Current Oncology, v. 30, n. 4, p. 3721-3734, 2023. BHOLA, R. et al. Histopathological evaluation of minor salivary gland aberrations in oral squamous cell carcinoma. Journal of Cancer Research and Therapeutics, v. 19, n. 2, p. 299-303, 2023. BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Diseases, v. 4, n. 2, p. 70-77, 1998. CUFFARI, L. et al. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, v. 102, n. 1, p. 56–61, 2006. DA SILVA SOUTO, A. C. et al. Epidemiology of tongue squamous cell carcinoma: A retrospective cohort study. Oral Diseases, v. 29, n. 2, p. 402-410, 2023. DANG, R. R. et al. Impact of depth of invasion on local recurrence in R0 resected node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. Head & Neck, v. 45, n. 3, p. 561-566, 2023. FAN, K. H. et al. Treatment Results of Postoperative Radiotherapy on Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Coexistence of Multiple Minor Risk Factors Results in Higher Recurrence Rates. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, v. 77, n. 4, p. 1024-1029, 2010. HAY, A. J. et al. Minor salivary gland tumors of the head and neck-Memorial Sloan Kettering experience: Incidence and outcomes by site and histological type. Cancer, v. 125, n. 19, p. 3354-3366, 2019. ILIE, Ionuţ-Octavian et al.

Características epidemiológicas e histopatológicas do carcinoma de células escamosas oral - um estudo retrospectivo. Current Health Sciences Journal, v. 50, n. 3, p. 411-420, 2024. INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018. KREPPEL, M. et al. Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma - Comparison of the prognostic significance. Oral Oncology, v. 60, p. 68-73, 2016. LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. Oral Oncology, v. 40, n. 10, p. 992-999, 2004. MATSUO, K. et al. Carcinoma de células escamosas da língua: subtipos e características morfológicas que afetam o prognóstico. American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 323, n. 6, p. C1611-C1623, 2022. NI, Y. et al. Loss of NF-kB1 and c-Rel accelerates oral carcinogenesis in mice. Oral Diseases, v. 27, n. 1, p. 168–172, 2021. PARK, S. I. et al. Clinical Outcome of Minor Salivary Gland Cancers in the Oral Cavity: A Comparative Analysis With Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. Frontiers in Oncology, v. 10, art. 881, 2020. REYES, M. et al. Wnt/β-Catenin Signaling in Oral Carcinogenesis. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 13, art. 4682, 2020. RIVERA, C. Essentials of oral cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, v. 8, n. 9, p. 11884-11894, 2015. SAWANT, S. et al. Role of Electron Microscopy in Early Detection of Altered Epithelium During Experimental Oral Carcinogenesis. Microscopy and Microanalysis, v. 25, n. 5, p. 1367–1375, 2019. SELVARAJ, F. M. et al. Significance of tumour budding and invasive characteristics in grading of oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, v. 27, n. 4, p. 642-648, 2023. SHANTI, R. M.; O'MALLEY JR, B. W. Surgical Management of Oral Cancer. Dental Clinics of North America, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2018. SLOAN, P. et al. Malignant surface epithelial tumours: Squamous cell carcinoma. In: EL-NAGGAR, A. K. et al. WHO classification of tumours of the head and neck. 4. ed. Lyon: IARC Press, 2017. p. 109-110. SPEIGHT, P. M. Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. Head and Neck Pathology, v. 1, n. 1, p. 55-60, 2007. SUPSAVHAD, W. et al. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. The Veterinary Journal, v. 210, p. 7–16, 2016. SUR, S. et al. Bitter Melon prevents the development of 4-NQO-induced oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent mouse model by modulating immune signalling. Cancer Prevention Research, v. 11, n. 4, p. 191–202, 2018. VERED, M. et al. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. Oral Oncology, v. 39, n. 5, p. 491-496, 2003. VIJAYAKUMAR, G. et al. Broder versus Bryne's histologic grading parameters on incision biopsy specimens: A comparative study with P53 and KI67 expression. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, v. 25, n. 1, p. 55-60, 2021.

CÓDIGO: SB0809

AUTOR: VINICIUS EDUARDO DA SILVA

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Estabelecimento de protocolo de imunofenotipagem por citometria de fluxo dos marcadores CD4 e IFN-y em modelo murino de câncer colorretal: correlações histopatológicas, hematológicas e bioquímicas

Resumo

O câncer colorretal (CCR) está entre as neoplasias de maior incidência e mortalidade mundial e, além de seu impacto local no organismo, pode promover alterações imunológicas, inflamatórias e metabólicas sistêmicas. A resposta antitumoral envolve diferentes populações celulares e mediadores, com destaque para os linfócitos T CD4+ e o interferon-gama (IFN-y), componentes relevantes na regulação da imunidade celular. Este estudo objetivou estabelecer um protocolo de imunofenotipagem do sangue periférico de murinos com câncer colorretal, avaliando CD4 e IFN-y e relacionando esses marcadores a parâmetros histopatológicos, hematológicos e bioquímicos. Foram utilizados dez camundongos BALB/c machos, distribuídos em grupo saudável e grupo com câncer induzido por inoculação subcutânea de células CT-26. No 28º dia, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para hemograma, análises bioquímicas e citometria de fluxo. Fígado e rins foram avaliados por histopatologia semiquantitativa. Os animais com câncer apresentaram alterações hematológicas compatíveis com inflamação sistêmica, aumento mais evidente da creatinina e maior comprometimento hepático ($p<0,05$). A citometria revelou redução de células IFN-y+ e aumento significativo da população CD4+/IFN-y+ ($p<0,0001$). O modelo murino mostrou-se útil para investigar a imunidade tumoral, suas repercussões sistêmicas e estratégias de modulação imunológica no CCR.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Citometria de fluxo; Interferon-gama; Modelo murino

TITLE: Establishment of a flow cytometry immunophenotyping protocol for CD4 and IFN-γ markers in a murine model of colorectal cancer: histopathological, hematological, and biochemical correlations.

Abstract

Colorectal cancer is among the malignancies with the highest incidence and mortality worldwide and, in addition to its local effects, can induce systemic immunological, inflammatory, and metabolic alterations. The antitumor response involves different cell populations and mediators, particularly CD4+ T lymphocytes and interferon-gamma (IFN-γ), which play relevant roles in the regulation of cellular immunity. This study aimed to establish a peripheral blood immunophenotyping protocol in a murine model of colorectal cancer by evaluating CD4 and IFN-γ expression and correlating these markers with histopathological, hematological, and biochemical parameters. Ten male BALB/c mice were allocated to a healthy control group and a cancer group in which tumors were induced through the subcutaneous inoculation of CT-26 cells. On day 28, the animals were euthanized, and blood samples were collected for complete blood count, biochemical analyses, and flow cytometry. The liver and kidneys were assessed using semiquantitative histopathological analysis. Tumor-bearing animals exhibited hematological alterations consistent with systemic inflammation, a more pronounced increase in serum creatinine, and greater hepatic impairment ($p < 0.05$). Flow cytometry revealed a reduction in IFN-γ+ cells and a significant increase in the CD4+/IFN-γ+ cell population. The murine model proved useful for investigating antitumor immunity, its systemic consequences, and potential immunomodulatory strategy in CCR

Keywords: Colorectal cancer; Flow cytometry; Interferon-gamma; murine model

Introdução

O câncer colorretal (CCR) permanece entre as neoplasias de maior impacto na saúde pública mundial, tanto pela elevada incidência quanto pelo número expressivo de óbitos associados à doença(1). No Brasil, também figura entre os tumores mais incidentes, reforçando sua relevância como problema de saúde pública e objeto de investigação biomédica(2).

O desenvolvimento do CCR é multifatorial e envolve alterações genéticas, epigenéticas, metabólicas e inflamatórias que favorecem a transformação progressiva do epitélio intestinal e a adaptação das células tumorais ao organismo(3). Nesse processo, o microambiente tumoral, composto por células neoplásicas, células imunes, matriz extracelular e mediadores inflamatórios, influencia diretamente o crescimento tumoral e a resposta ao tratamento(4). Características moleculares, como a instabilidade de microssatélites e alterações nos mecanismos de reparo do DNA, também podem modificar a infiltração imune, a expressão de *checkpoints* imunológicos e a sensibilidade à imunoterapia(5).

A resposta imune exerce papel central na vigilância contra células mutadas, mas pode ser progressivamente remodelada pelo tumor. O interferon-gama (IFN-γ) participa da ativação de macrófagos, do aumento da apresentação antigênica e da organização da ação efetora de linfócitos T e células NK(6). Entretanto, sua sinalização prolongada pode favorecer mecanismos de adaptação tumoral, incluindo aumento da expressão de moléculas inibitórias, como PD-L1, e seleção de células menos responsivas(7). Entre as populações envolvidas, os linfócitos T CD4+ destacam-se por coordenarem diferentes componentes da imunidade, sustentarem respostas citotóxicas e produzirem citocinas(8,9). Contudo, a exposição contínua aos antígenos tumorais e mediadores imunossupressores pode comprometer sua funcionalidade, favorecendo exaustão e perda parcial de função(10).

Além das alterações locais, o CCR pode produzir repercussões sistêmicas detectáveis no sangue periférico11. Modificações em subpopulações de linfócitos T, células NK e células produtoras de citocinas reforçam a utilidade da imunofenotipagem periférica para avaliar a resposta imune sistêmica(12,13). Paralelamente, alterações hematológicas e bioquímicas associadas à inflamação tumoral, como aumento de neutrófilos, redução proporcional de linfócitos e mudanças em parâmetros plaquetários, têm sido relacionadas à progressão e ao prognóstico(14,15). As plaquetas também podem contribuir para a angiogênese, proteção de células tumorais circulantes, modulação de mecanismos envolvidos no escape imune e metástase(16).

Modelos experimentais em camundongos imunocompetentes permitem avaliar de forma integrada crescimento tumoral, resposta imune e repercussões sistêmicas17. A linhagem celular CT-26, derivada de carcinoma colorretal murino, é amplamente empregada em camundongos BALB/c por constituir um modelo capaz de preservar a interação entre tumor e sistema imune(18). Sua imunogenicidade torna-se útil para estudos de imunologia tumoral, resposta inflamatória e avaliação de marcadores imunofenotípicos(19,20). A interpretação desses modelos também deve considerar parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos, que podem variar conforme fatores biológicos e experimentais(21). Além disso, o fígado apresenta relevância pela relação com a disseminação hematogênica do CCR, enquanto o rim pode refletir repercussões sistêmicas indiretas associadas ao estado tumoral(22,23).

Diante disso, a integração entre citometria de fluxo, hemograma, dosagens bioquímicas e análise histopatológica permite uma avaliação ampla do impacto sistêmico do CCR. A imunofenotipagem de células CD4+, IFN-γ+ e CD4+/IFN-γ+ pode contribuir para caracterizar aspectos da resposta imune periférica(12), enquanto sua associação com parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos auxilia na compreensão das alterações inflamatórias, imunológicas e sistêmicas reproduzidas pelo modelo CT-26 em camundongos BALB/c(18).

Metodologia

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos, da espécie Mus musculus, com 8 semanas de idade e pesando entre 21 e 28 gramas, para o modelo de indução tumoral. Os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Medicina Tropical da UFRN e mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal em Farmacologia da Inflamação e Investigação do Câncer (LAFINC) de acordo com os princípios éticos para experimentação animal. O projeto em que esse estudo está inserido foi aprovado pela CEUA/UFRN pelo n. 344.026/2023. Os animais foram alojados em gaiolas a 22 °C, com ventilação filtrada individual e exaustão automatizada com capacidade para 30 trocas de ar por hora, mantendo-os em ciclo claro/escuro de 12 horas. A nutrição animal foi estabelecida de forma que a água e comida foram livremente acessíveis durante todo o período de experimentação.

Indução tumoral e grupos experimentais

Para a indução tumoral in vivo foi realizada inoculação subcutânea de 1x106 células tumorais da linhagem CT-26 no flanco direito de cada animal macho. Os animais foram divididos em 2 grupos com 5 animais cada: Grupo 1 (Animais machos saudáveis), Grupo 2 (Animais machos com câncer colorretal induzido). Os animais de ambos os grupos foram submetidos a um período de jejum de 2 horas, em logo em seguida foram eutanasiados ao 28º dia de experimento.

Coleta sanguínea

Para a coleta sanguínea os animais foram anestesiados com injeção intra-abdominal de xilazina (20 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) seguindo todos os parâmetros éticos em experimentação animal. Utilizou-se uma seringa para a realização da punção intracardíaca e obtenção do sangue total. As amostras sanguíneas foram acondicionadas em tubos com EDTA para análises hematológicas e de imunofenotipagem, e em tubos com ativador de coágulo foram colhidos o sangue para análises bioquímicas.

Análise histopatológica

Para as análises histopatológicas, logo após a eutanásia, o fígado e os rins de cada animal foram fixados em formaldeído a 4% (m/v) e posteriormente submetidos a processamento histológico seguido de coloração por hematoxilina e eosina (H&E) realizados no Laboratório de Histotécnicas do Departamento de Morfologia (UFRN). As lâminas foram analisadas com foco em alterações indicativas de toxicidade, como: edema, hemorragia e congestão vascular, infiltrado inflamatório, angiogênese e necrose. Os parâmetros analisados foram avaliados usando um sistema de escore variando de 1 a 4, onde 1 = ausente, 2 = leve, 3 = moderado e 4 = intenso para cada parâmetro. Os campos foram explorados em ampliação de 400× e pontuados com base em critérios morfológicos descritos por Bhattamisra et al (2019)24. Um examinador treinado analisou as imagens usando um microscópio de luz (Nikon Eclipse 2000 equipado com Nikon DS-Fi2; Nikon Corporation, Tóquio, Japão). As imagens

foram adquiridas no software Zen Blue versão 3.13 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Dosagens bioquímicas

Cerca de 500 uL de sangue total foram acondicionados em tubo com ativador de coágulo. Após centrifugação, obteve-se o soro sanguíneo, o qual foi utilizado para análises dos marcadores hepáticos AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) e renais (Ureia e Creatinina) em Analisador bioquímico semiautomático BIO-2000 (Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda., Barueri, SP, Brasil).

Hematologia

Em tubo com anticoagulante EDTA foram obtidos cerca de 250 uL de sangue total para exame de hemograma. A amostra foi analisada por hemocitômetro automático URIT BH-70P VET (URIT Medical Electronic Co. Ltd., Guilin, China). Os parâmetros avaliados incluem contagem total de eritrócitos, dosagem de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), VGM (Volume Globular Médio) (fL), HGM (Hemoglobina Globular Média) (pg), CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média) (g/dL), contagem global de leucócitos (cél/µL) e diferencial (% e células/µL) de leucócitos, assim como plaquetograma. As amostras foram analisadas no Laboratório de Farmacologia e Bioanálises do Centro de Biociências (UFRN).

Citometria de fluxo

Após a coleta sanguínea com EDTA de cada animal, 100 uL de sangue total foram transferidos para um tubo de hemólise de 4 mL, tratados com 1,5 mL de ACK lysing buffer Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.) para hemólise das hemácias, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Após duas lavagens com solução PBS 1X e centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, foi realizada uma incubação prévia com solução de PBA 0,5% (solução tamponada com fosfato contendo albumina) por 20 minutos para bloqueio de ligações inespecíficas. Os anticorpos, adquiridos da Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Anti-mouse CD4 (PerCP-Cyanine5.5) e Anti-mouse IFN-gama (FITC) foram diluídos em 1:80 e 1:100 (v/v), respectivamente, em solução PBA 0,5%. As amostras foram centrifugadas, e posteriormente o pellet ressuspenso em 100 uL de PBA 0,5% com aplicação dos anticorpos descritos segundo recomendações do fabricante.

A aquisição das amostras foi definida como 10000 eventos e realizadas no Setor de Citometria de Fluxo do Hemocentro Dalton Cunha (HEMONORTE/RN) no equipamento DxFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A estratégia de gate foi definida conforme Cossarizza et al. (2021)25 (ANEXO 1). Os dados do citômetro de fluxo foram analisados com o software FlowJo, versão 10.10.0 (BD LifeSciences, Ashland, OR, EUA).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Empregou-se o teste t student com correção de Welch para variáveis contínuas com distribuição paramétrica, e para variáveis ordinais foi utilizado o teste de Mann–Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (ns > 0,05; * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001). Para os gráficos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, e para as tabelas como média ± erro padrão da média.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

Perfil bioquímico

As análises bioquímicas (Anexo II) evidenciaram discreta tendência de elevação da AST no grupo dos animais com câncer colorretal induzido em relação ao grupo saudável, com médias de 179 ± 30 UI/L e 156 ± 20 UI/L, respectivamente. Em contraste, a creatinina apresentou aumento mais evidente no grupo dos animais com câncer colorretal, alcançando 0,69 ± 0,19 mg/dL, enquanto no grupo saudável foi de 0,18 ± 0,012 mg/dL.

Um resumo geral de todos os dados das análises bioquímicas pode ser observado no Anexo III.

Perfil hematológico

No eritrograma (Anexo IV), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os parâmetros como contagem global de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e RDW (Anexo IV). Entretanto, a hemoglobina globular média (HGM) apresentou redução significativa no grupo dos animais com câncer colorretal, com média de 15,60 ± 0,78 pg, em comparação ao grupo saudável, que apresentou 17,28 ± 0,08 pg, com $p < 0,05$.

No leucograma (Anexo V), a contagem total de leucócitos apresentou aumento no grupo dos animais com câncer colorretal induzido, com média de 9900 ± 3230 cél/µL, em comparação ao grupo saudável, com 3100 ± 315 cél/µL, sem diferença estatisticamente significativa. Em relação à distribuição diferencial, observou-se redução significativa da porcentagem de linfócitos típicos no grupo doente (35,4 ± 11,4%) em comparação ao grupo saudável (81,3 ± 1,9%) ($p < 0,05$). Além disso, os linfócitos reativos apresentaram aumento significativo no grupo com câncer colorretal induzido (3,8 ± 0,9%) em relação ao grupo saudável (2,0 ± 0,8%) ($p < 0,05$). Também foi identificado aumento expressivo e significativo da porcentagem de neutrófilos segmentados nos animais doentes

(55,6 ± 0,3%) quando comparados aos saudáveis (12,0 ± 2,7%), com $p < 0,01$. Para monócitos e neutrófilos bastão, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

No plaquetograma (Anexo VI), a contagem total de plaquetas mostrou-se elevada no grupo dos animais com câncer colorretal (1163 ± 113 × 10^3/µL) em relação ao grupo saudável (889 ± 166 × 10^3/µL), porém sem significância estatística. O volume plaquetário médio (VPM) e a amplitude de distribuição plaquetária (PDW) também não diferiram significativamente entre os grupos. Em contraste, o plaquetócrito (PCT) apresentou aumento significativo nos animais com câncer colorretal, com média de 0,60 ± 0,13%, em comparação ao grupo saudável, que apresentou 0,38 ± 0,07%.

Um resumo geral de todos os dados das análises hematológicas pode ser observado no Anexo VII.

Análise histopatológica

Na avaliação histopatológica renal (Anexo VIII), observou-se aumento significativo apenas do parâmetro hemorragia/congestão no grupo dos animais com câncer colorretal induzido ($p < 0,01$). Os escores de edema, infiltrado inflamatório, angiogênese e necrose não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Anexo 9).

No fígado, os animais com câncer colorretal apresentaram aumento significativo dos escores de edema ($p < 0,001$), hemorragia e congestão ($p < 0,0001$) e infiltrado inflamatório ($p < 0,01$) em comparação ao grupo saudável. Os parâmetros angiogênese e necrose não diferiram significativamente entre os grupos, embora a necrose tenha mostrado discreta elevação no grupo dos animais com câncer colorretal (Anexo IX).

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A imunofenotipagem de sangue periférico (Anexo X) demonstrou que a frequência de células CD4+ não diferiu significativamente entre os grupos saudável e dos animais com câncer colorretal (Anexo XI). Entretanto, a porcentagem de células IFN-γ+ mostrou redução significativa nos animais com câncer colorretal ($p < 0,05$), e a população duplo positiva CD4+/IFN-γ+ apresentou aumento acentuado e significativo neste mesmo grupo ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a indução tumoral foi acompanhada por repercussões sistêmicas detectáveis no sangue periférico e em órgãos-alvo, configurando um perfil compatível com inflamação associada ao câncer colorretal e remodelamento imune periférico26. Em consonância a isso, já está bem estabelecido na literatura que, no câncer colorretal, a progressão tumoral é reconhecidamente acompanhada por alterações da imunidade sistêmica, disfunção da produção de citocinas regulatórias e mudanças em populações

hematológicas circulantes, especialmente quando a doença se torna mais agressiva e disseminada27,28.

No eritrograma, a preservação de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e VGM, associada apenas à redução significativa da HGM, sugere que o modelo ainda não evoluiu para um quadro de anemia neoplásica plenamente estabelecida, embora já apresente sinais iniciais de alterações hematológicas29. Esse comportamento pode ser justificado, já que alterações eritrocitárias no contexto do câncer frequentemente se intensificam com a sua progressão e com o comprometimento metabólico, não sendo obrigatoriamente intensas em estágios iniciais ou intermediários de repercussão sistêmica30. Além disso, outros biomarcadores hematológicos inflamatórios, como neutrófilos e linfócitos, têm sido apontados como mais sensíveis que o eritrograma convencional para captar precocemente a atividade biológica desencadeada pelo tumor31.

O leucograma, por sua vez, revelou um padrão mais característico de inflamação tumoral, marcado por linfopenia e neutrofilia relativa expressiva. A redução da porcentagem de linfócitos típicos, acompanhada do aumento acentuado de neutrófilos segmentados, reforça a presença de um desvio imunológico favorável aos componentes mieloides associados à progressão tumoral. Esse perfil tem sido consistentemente relacionado, no câncer colorretal, a pior prognóstico, maior agressividade biológica, maior valor de índices como NLR (Razão Neutrófilo-Linfócito) e marcadores compostos derivados de neutrófilos, linfócitos e plaquetas14,32. Além disso, a neutrofilia não representa apenas uma resposta inflamatória inespecífica, pois neutrófilos associados ao tumor podem favorecer angiogênese, remodelamento tecidual e imunossupressão, conforme proposto na literatura33.

O aumento significativo de linfócitos reativos pode ser interpretado como um indício de ativação imunológica periférica em resposta ao tumor, embora essa ativação não pareça suficiente para estabelecer uma resposta antitumoral propriamente eficaz12,34. Nas neoplasias colorretais, alterações em subpopulações circulantes de células imunes já foram descritas como reflexo da interação entre o tumor e o sistema imune periférico, reforçando a utilidade do sangue periférico como matriz de suporte para monitoramento imunológico em pacientes com CCR27. Dessa forma, a coexistência de linfócitos reativos aumentados com neutrofilia e linfopenia sugere uma resposta imune desorganizada, em que ativação e supressão coexistem12,35.

No plaquetograma, a elevação significativa do plaquetócrito, mesmo sem diferença estatística para a contagem total de plaquetas, sugere uma discreta ativação do eixo trombo-inflamatório associado ao tumor. Esse resultado possui relevância biológica, pois as plaquetas participam ativamente da carcinogênese e da disseminação metastática por meio de adesão a células tumorais, secreção de mediadores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, além de favorecer o escape imunológico de células neoplásicas15. No câncer colorretal, a interação entre plaquetas e células tumorais mediada por P-selectina tem sido descrita como funcionalmente importante para o desenvolvimento tumoral. Além disso, a literatura reforça que as plaquetas favorecem a sobrevivência tumoral intravascular, a adesão endotelial e a colonização de sítios secundários36,37.

As alterações histopatológicas hepáticas observadas no grupo doente, com aumento significativo de edema, hemorragia, congestão e infiltrado inflamatório, indicam que houve uma influência negativa no fígado sob ação do tumor, principalmente ao se correlacionar com as dosagens de AST e ALT, nas quais a AST apresentou elevação discreta, ainda que essa enzima, isoladamente, não seja uma evidência forte de dano hepático considerável. No contexto do câncer colorretal, esses achados se correlacionam com a característica fisio-histológica do fígado como o principal sítio de disseminação metastática38. Evidências experimentais demonstram que o tumor pode induzir, antes mesmo do estabelecimento definido da metástase, um nicho pré-metastático inflamatório e imunossupressor no fígado, frequentemente mediado por vesículas extracelulares e citocinas22,39. Dessa forma, o padrão histológico hepático encontrado é compatível com um microambiente tecidual progressivamente mais permissivo à progressão tumoral.

Em relação ao rim, o aumento significativo do escore de hemorragia/congestão no grupo doente, associado ao aumento da dosagem sérica de creatinina, sugere repercussão sistêmica tumoral também sobre a matriz renal, ainda que mais discreta do que a observada no fígado. Embora o rim não seja o principal sítio metastático do câncer colorretal, a literatura demonstra que a função renal possui relevância prognóstica nessa neoplasia e que indivíduos com câncer colorretal apresentam maior risco de lesão renal aguda e pior evolução clínica quando há comprometimento renal associado23,40. Desse modo, mesmo que os dados bioquímicos ainda não expressem injúria renal grave, os achados histológicos e o aumento da creatinina apontam para a necessidade de considerar a repercussão renal como parte do impacto sistêmico do tumor.

Ademais, observou-se que a dosagem de creatinina para os animais saudáveis estava abaixo do intervalo de referência proposto pelo estudo usado como modelo. Isso ressalta a importância de se realizarem dosagens em estudos de caracterização de população para uma melhor análise comparativa entre os modelos experimentais. Essa é uma necessidade relevante, uma vez que as dosagens sofrem a influência de múltiplos fatores, como condições específicas do biotério, manejo, dieta, idade, estado fisiológico, protocolo de contenção e coleta, processamento das amostras e metodologia analítica empregada41,42.

A análise da imunofenotipagem indicou que a indução tumoral foi acompanhada de uma relevante modificação no perfil imunológico periférico dos animais, evidenciada pela maior frequência da população de células CD4+/IFN-γ+ no grupo doente. Esse resultado se mostra coerente com a ativação de uma resposta imune de padrão Th1, uma vez que linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ participam da iniciação, coordenação e manutenção da imunidade antitumoral, contribuindo para o controle do desenvolvimento tumoral12,43,44. Além disso, estudos recentes já demonstram que a imunovigilância realizada por células T durante a tumorigênese inicial exerce pressão seletiva principalmente sobre as células tumorais, enquanto o IFN-γ produzido diretamente por linfócitos T pode atuar como um ponto-chave na ação antitumoral, tornando biologicamente plausível a expansão dessa subpopulação no grupo doente44,45.

Ainda assim, o aumento de células CD4+/IFN-γ+ não pode ser interpretado, de forma isolada, como constatação de proteção tumoral efetiva. O IFN-γ consiste em uma citocina tradicionalmente vinculada à imunidade antitumoral, e a sensibilidade intrínseca das células tumorais aos seus efeitos pró-apoptóticos pode ser determinante para a regressão tumoral em modelos experimentais, conforme demonstrado experimentalmente44. Contudo, sua atuação depende do contexto biológico em que se insere. Em modelos derivados de células CT-26, já foi demonstrado que células tumorais submetidas à pressão imune podem adquirir mecanismos de escape por perda pós-transcricional da expressão antigênica, reduzindo sua capacidade de estimular respostas imunes antígeno-específicas e de induzir IFN-γ por células efetoras46. Além disso, estudos recentes indicam que condições do microambiente tumoral, como a acidose, podem amplificar a expressão de PD-L1 induzida por IFN-γ em células tumorais, favorecendo mecanismos de evasão imune dependentes do eixo STAT1/PD-L147. Paralelamente, a sinalização prolongada de interferons pode induzir resistência adaptativa à imunoterapia e aumentar a expressão de moléculas como PD-L1 e PD-L2, favorecendo a evasão imune48,49. Assim, os dados sugerem uma modulação imune sistêmica relacionada ao desenvolvimento tumoral.

Outro ponto a ser considerado é o próprio modelo de indução experimental empregado, já que a linhagem celular CT-26 é amplamente utilizada em investigações sobre câncer colorretal murino e vem sendo descrita como um modelo tumoral altamente imunogênico, capaz de desencadear respostas imunes detectáveis, o que reforça a consistência biológica do perfil identificado18. Ao mesmo tempo, por ter sido utilizado sangue periférico, os dados obtidos expressam a dimensão sistêmica da resposta imunológica e não, necessariamente, a dinâmica celular no microambiente tumoral. Em ênfase, estudos comparando sangue periférico e tecido tumoral mostram que os dois sistemas podem apresentar perfis imunes distintos, de modo que a imunidade periférica fornece marcadores importantes, mas nem sempre reproduz com fidelidade o infiltrado tumoral localizado(50,51).

Dessa forma, os resultados demonstram que a presença do tumor no grupo doente esteve associada a um deslocamento do perfil imunofenotípico periférico, com aumento da frequência de linfócitos CD4+/IFN-γ+ em comparação ao grupo saudável. Esse padrão sustenta a hipótese de que o câncer colorretal induzido foi capaz de mobilizar uma resposta imune sistêmica própria e caracterizável, em concordância com estudos que demonstram alterações detectáveis em populações imunes circulantes na presença do tumor (28,52).

Em modelos murinos, também já foi observado que a produção periférica de IFN-γ por linfócitos se associa ao comportamento tumoral, reforçando a sua relevância biológica sistêmica53. Entretanto, para uma compreensão mais densa do significado biológico dos resultados, seria pertinente relacioná-lo, em estudos futuros, à análise do infiltrado tumoral, de outras subpopulações linfocitárias e de marcadores específicos de linhagem, já que abordagens integrando sangue periférico e tecido tumoral tendem a oferecer uma interpretação mais robusta da resposta imune antitumoral(51).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que o modelo experimental de câncer colorretal em camundongos BALB/c foi capaz de evidenciar alterações sistêmicas relevantes, envolvendo parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos e imunológicos. Destacaram-se, principalmente, o aumento de neutrófilos segmentados, a redução de linfócitos típicos, a elevação do plaquetócrito, as alterações histológicas hepáticas e as modificações no perfil de expressão de IFN-y, indicando que a progressão tumoral repercute além do sítio primário, afetando sistemicamente a homeostase do organismo.

Além disso, as análises realizadas reforçam a importância da caracterização desses parâmetros para a padronização de pesquisas que utilizam esse tipo de modelo experimental, uma vez que os resultados podem variar conforme fatores como ambiente, condições de criação dos animais em biotério, manejo, dieta, estresse e tempo de evolução tumoral. Sendo assim, a caracterização de perfis hematológicos, bioquímicos e imunológicos nesse contexto contribui para aumentar a reprodutibilidade, a comparabilidade entre estudos e a robustez da interpretação dos achados em pesquisas pré-clínicas dentro da oncologia experimental, particularmente útil ao nosso grupo de pesquisa, uma vez que o estabelecimento dessa metodologia constitui uma aplicação analítica fundamental na interpretação de estudos futuros.

Referências

1. BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834.
2. MARTINS, L. F. L. et al. Perfil Epidemiológico da Incidência de Câncer no Brasil e Regiões: Estimativas para o Triênio 2026-2028. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 72, n. 2, e-025587, 2026. DOI: https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2026v72n2.5587. Disponível em: https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/5587. Acesso em: 20 mar. 2026.
3. LI, Q. et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 9, 2024. DOI: 10.1038/s41392-024-01953-7.
4. ANDAC-AKTAS, A. B.; CALIBASI-KOCAL, G. Immunological landscape of colorectal cancer: tumor microenvironment, cellular players and immunotherapeutic opportunities. Frontiers in Molecular Biosciences, v. 12, art. 1687556, 2025. DOI: 10.3389/fmolb.2025.1687556.

5. WANG, Q.; YU, M.; ZHANG, S. The characteristics of the tumor immune microenvironment in colorectal cancer with different MSI status and current therapeutic strategies. Frontiers in Immunology, v. 15, art. 1440830, 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1440830.
6. HAN, J.; WU, M.; LIU, Z. Dysregulation in IFN-γ signaling and response: the barricade to tumor immunotherapy. Frontiers in Immunology, v. 14, art. 1190333, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1190333.
7. LIU, Y. et al. Dual regulation of gastrointestinal tumor progression by the IFN-γ/STAT1 pathway and prospects for targeted therapy. Frontiers in Oncology, v. 15, art. 1598170, 2025. DOI: 10.3389/fonc.2025.1598170.
8. TOPCHYAN, P.; LIN, S.; CUI, W. The role of CD4 T cell help in CD8 T cell differentiation and function in chronic infection and cancer. Immune Network, v. 23, n. 5, e41, 2023. DOI:https://doi.org/10.4110/in.2023.23.e41.
9. OH, D. Y.; FONG, L. Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: expanding the immune effector toolbox. Immunity, v. 54, n. 12, p. 2701-2711, 2021. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.11.015.
10. VENKATESH, H.; FONG, L. CD4+ T cell dysfunction in cancer. Journal of Experimental Medicine, v. 222, n. 9, e20241417, 2025. DOI: 10.1084/jem.20241417.
11. MARTINEZ-USATORRE, A. et al. Human blood cell transcriptomics unveils dynamic systemic immune modulation during colorectal cancer progression. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, v. 12, n. 11, e009888, 2024. DOI: 10.1136/jitc-2024-009888.
12. ZHANG, L. et al. Characteristics of circulating adaptive immune cells in patients with colorectal cancer. Scientific Reports, v. 12, n. 1, art. 18166, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-23190-0.
13. SÁNCHEZ-MENÉNDEZ, C. et al. Differences in the peripheral blood immune landscape between early-onset and late-onset colorectal cancer. Frontiers in Immunology, v. 16, art. 1692382, 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1692382.
14. TURRI, G. et al. Pre-diagnostic prognostic value of leukocytes count and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients who develop colorectal cancer. Frontiers in Oncology, v. 13, art. 1148197, 2023. DOI: 10.3389/fonc.2023.1148197.
15. GUO, G. et al. Potential impact of platelet-to-lymphocyte ratio on prognosis in patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in Surgery, v. 10, art. 1139503, 2023. DOI: 10.3389/fsurg.2023.1139503.
16. GAN, J.; ZHANG, X.; GUO, J. The role of platelets in tumor immune evasion and metastasis: mechanisms and therapeutic implications. Cancer Cell International, v. 25, n. 1, art. 258, 2025. DOI: 10.1186/s12935-025-03877-w.
17. GUTIERREZ, W. R. et al. Divergent immune landscapes of primary and syngeneic Kras-driven mouse tumor models. Scientific Reports, v. 11, art. 1098, 2021. DOI: 10.1038/s41598-020-80216-1.
18. SATO, Y. et al. Tumor-immune profiling of CT-26 and Colon 26 syngeneic mouse models reveals mechanism of anti-PD-1 response. BMC Cancer, v. 21, art. 1222, 2021. DOI: 10.1186/s12885-021-08974-3.

19. THOMAS, E. M. et al. Advancing translational research for colorectal immuno-oncology. British Journal of Cancer, v. 129, n. 9, p. 1442-1450, 2023. DOI: 10.1038/s41416-023-02392-x.
20. SNIPSTAD, S. et al. Characterization of immune cell populations in syngeneic murine tumor models. Cancer Medicine, v. 12, n. 10, p. 11589-11601, 2023. DOI: 10.1002/cam4.5784.
21. SILVA-SANTANA, G. et al. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 Mus musculus. Animal Models and Experimental Medicine, v. 3, n. 4, p. 304-315, 2020. DOI: 10.1002/ame2.12139.
22. LI, Y. et al. Understanding pre-metastatic niche formation: implications for colorectal cancer liver metastasis. Journal of Translational Medicine, v. 23, art. 340, 2025. DOI: 10.1186/s12967-025-06328-2.
23. ANDRESEN, K. et al. The risk of acute kidney injury in colorectal cancer survivors: an English population-based matched cohort study. BMC Cancer, v. 23, art. 839, 2023. DOI: 10.1186/s12885-023-11329-9.
24. BHATTAMISRA, S. K. et al. Protective activity of geraniol against acetic acid and Helicobacter pylori-induced gastric ulcers in rats. Journal of Traditional and Complementary Medicine, v. 9, n. 3, p. 206-214, 2019. DOI: 10.1016/j.jtcme.2018.05.001.
25. COSSARIZZA, A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). European Journal of Immunology, v. 51, n. 12, p. 2708–3145, 2021. DOI: 10.1002/eji.202170126.
26. LI, W. et al. Cytokine concentration in peripheral blood of patients with colorectal cancer. Frontiers in Immunology, v. 14, art. 1175513, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1175513.
27. CHOI, J. et al. Diagnostic value of peripheral blood immune profiling in colorectal cancer. Annals of Surgical Treatment and Research, v. 94, n. 6, p. 312-321, 2018. DOI: 10.4174/astr.2018.94.6.312.
28. LU, C. et al. Analysis of circulating immune subsets in primary colorectal cancer. Cancers, v. 14, n. 24, art. 6105, 2022. DOI: 10.3390/cancers14246105.
29. SALA, R. J. et al. Complete blood count alterations prior to the diagnosis of colorectal cancer may help in the detection of synchronous liver metastases. Journal of Clinical Medicine, v. 12, n. 20, art. 6540, 2023. DOI: 10.3390/jcm12206540.
30. YAMAMOTO, T.; KAWADA, K.; OBAMA, K. Inflammation-related biomarkers for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 15, art. 8002, 2021. DOI: 10.3390/ijms22158002.
31. MERCIER, J.; VOUTSADAKIS, I. A. The platelets-neutrophils to lymphocytes ratio: a new prognostic marker in metastatic colorectal cancer. Journal of Gastrointestinal Oncology, v. 9, n. 3, p. 478-486, 2018. DOI: 10.21037/jgo.2018.03.13.
32. NASZAI, M.; KURJAN, A.; MAUGHAN, T. S. The prognostic utility of pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte-ratio (NLR) in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Cancer Medicine, v. 10, n. 17, p. 5983-5997, 2021. DOI: 10.1002/cam4.4143.

33. MIZUNO, R. et al. The role of tumor-associated neutrophils in colorectal cancer. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 3, art. 529, 2019. DOI: 10.3390/ijms20030529.
34. KRIJGSMAN, D. et al. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. Cancer Immunology, Immunotherapy, v. 68, n. 6, p. 1011-1024, 2019. DOI: 10.1007/s00262-019-02343-7.
35. ZHU, W. et al. Quantitative proteomic analysis reveals functional alterations of the peripheral immune system in colorectal cancer. Molecular & Cellular Proteomics, v. 23, n. 6, art. 100784, 2024. DOI: 10.1016/j.mcpro.2024.100784.
36. SCHLESINGER, M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. Journal of Hematology & Oncology, v. 11, art. 125, 2018. DOI: 10.1186/s13045-018-0669-2.
37. QI, C. et al. P-selectin-mediated adhesion between platelets and tumor cells promotes intestinal tumorigenesis in ApcMin/+ mice. International Journal of Biological Sciences, v. 11, n. 6, p. 679-687, 2015. DOI: 10.7150/ijbs.11589.

Anexos



Estratégia de gate empregada na análise por citometria de fluxo.



Análise estatística dos parâmetros bioquímicos entre os grupos saudável e doente



ANEXO III



ANEXO IV



ANEXO V



ANEXO VI



ANEXO VII



ANEXO VIII



ANEXO IX



ANEXO X



ANEXO XI

CÓDIGO: SB0815

AUTOR: ANA CAROLINA REVOREDO GALVAO

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM LIPODISTROFIA PARCIAL FAMILIAR E HIPOGLICEMIA HIPOCETÓTICA HIPOINSULINÊMICA POR VARIANTES PATOGÊNICAS NO GENE AKT2

Resumo

O gene *AKT2* está envolvido em diversos processos metabólicos do organismo, como adipogênese, inibição da lipólise, inibição da gliconeogênese e captação de glicose. Desse modo, variantes nesse gene podem alterar as funções exercidas pela proteína AKT2 e gerar doenças, como a lipodistrofia parcial familiar relacionada a *AKT2* e a hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica. Essas duas doenças, embora relacionadas ao mesmo gene, possuem características aparentemente antagônicas. Por isso, foi realizada uma revisão bibliográfica nas bases de dados PubMed e Web Of Science, a fim de comparar as duas doenças e compreender a fisiopatologia delas Ademais, os resultados obtidos na revisão foram utilizados para a elaboração de um trabalho de conclusão de curso. Além disso, foi realizada divulgação científica referente às lipodistrofias e o metabolismo do tecido adiposo por meio do perfil do Instagram @lipodistrofia.brasil e da apresentação de resumos sobre as lipodistrofias em congressos. Essas ações foram realizadas a fim de que um público maior conheça sobre o assunto e o diagnóstico dessas doenças seja facilitado. Logo, o presente trabalho se relaciona ao objetivo 3 do Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU).

Palavras-chave: AKT2. Doenças genéticas. Divulgação científica.

TITLE: MOLECULAR ANALYSIS OF PATIENTS WITH FAMILIAL PARTIAL LIPODYSTROPHY AND HYPOINSULINEMIC HYPOKETOTIC HYPOGLYCEMIA DUE TO PATHOGENIC VARIANTS IN THE AKT2 GENE

Abstract

The *AKT2* gene is involved in several metabolic processes in the body, such as adipogenesis, inhibition of lipolysis, inhibition of gluconeogenesis and glucose uptake. Thus, variants in this gene can alter the functions performed by the AKT2 protein and generate diseases, such as familial partial lipodystrophy related to *AKT2* and hypoketotic hypoglycemia hypoinsulinemic. These two diseases, although related to the same gene, have apparently antagonistic characteristics. Therefore, a bibliographic review was carried out in the PubMed and Web Of Science databases, in order to compare the two diseases and understand their pathophysiology. Furthermore, the results obtained in the review were used to prepare a final course work. In addition, scientific dissemination regarding lipodystrophies and adipose tissue metabolism was done through the Instagram profile @lipodystrophy.brasil and the presentation of abstracts on lipodystrophies at conferences. These actions were done in order to make more people know about the subject and the diagnosis of these diseases is facilitated. Therefore, this work is related to Sustainable Development Objective 3 of the United Nations (UN) 2030 Agenda.

Keywords: AKT2. Genetic diseases. Scientific dissemination.

Introdução

As lipodistrofias são doenças raras e heterogêneas em que há a distribuição anormal de tecido adiposo pelo corpo (Lima *et al.*, 2021), podendo apresentar também diabetes mellitus, resistência à insulina, esteatose hepática, acantose nigricans, baixas concentrações séricas de adiponectina e de leptina, entre outros (Campos *et al.*, 2021). Quando possuem origem genética, elas são ocasionadas por mutações em genes relacionados ao metabolismo do tecido adiposo e adipogênese, como *LMNA, CAV1, CAVIN1, PPARG, BSCL2, LIPE, CIDEC, AGPAT2, PLIN1* (Campos *et al.*, 2021) e *AKT2* (Araújo-Vilar; Santini, 2018).

O gene AKT serina/treonina quinase 2, também chamado de *AKT2*, codifica a proteína RAC-beta serina/treonina proteína quinase ou AKT2, a qual possui 3 domínios, sendo o primeiro deles o domínio de homologia à pleckstrina, também chamado de domínio PH, o qual compreende os aminoácidos 5 a 108 da proteína; o domínio proteína quinase, que abrange os aminoácidos 152 a 409; seguido pelo domínio AGC-quinase C-terminal, composto pelos aminoácidos 410 a 481 (UniProt, 2026). Essa proteína exerce a função de fosforilar outras proteínas, fazendo parte de vias metabólicas relacionadas à sinalização de insulina, como a inibição da lipólise (Vigouroux *et al.*, 2011), a inibição da gliconeogênese, a captação de glicose (Arya *et al.*, 2014), além da adipogênese (George et al., 2004), proliferação celular e angiogênese (NCBI, 2026).

Além da lipodistrofia, variantes em regiões específicas do gene *AKT2* podem ocasionar o surgimento de outras doenças de origem genética, como a hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica (Minic *et al.*, 2017).

Pacientes com hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica apresentam quadros hipoglicêmicos severos com concentrações séricas de insulina indetectáveis, embora possam apresentar acantose nigricans, a qual é uma característica normalmente associada à hiperinsulinemia (Welters *et al.*, 2023; Molina *et al.*, 2021). Portanto, foi realizada uma revisão bibliográfica para compreender a fisiopatologia dessas doenças, comparando-as; além de ter sido realizada a divulgação científica sobre o tecido adiposo para a comunidade científica e a comunidade externa à universidade.

Metodologia

Para compreender a fisiopatologia da lipodistrofia parcial familiar associada a *AKT2* e da hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica e compará-las, foram realizadas pesquisas nas bases de dados PubMed e Web Of Science.
Para a divulgação científica acerca das lipodistrofias e do metabolismo do tecido adiposo, foram produzidas postagens e *quizzes* semanais para o *Instagram*@lipodistrofia.brasil e um resumo foi submetido para um congresso de genética.

Resultados e Discussões

A partir da busca nos bancos de dados, foram vistos 6 casos de pacientes com lipodistrofia parcial familiar associada a *AKT2*, devido à variante c.821 G>A, isto é uma substituição do nucleotídeo 821 de uma guanina por uma adenina no gene *AKT2*; e 9 casos de pacientes com hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica, devido à variante *AKT2* c.49 G>A, isto é, uma substituição do nucleotídeo 49 de uma guanina por uma adenina no gene em questão.
Foi visto que os pacientes com lipodistrofia parcial familiar associada a *AKT2* apresentavam hipertrigliceridemia, diabetes mellitus tipo 2, hiperinsulinemia e esteatose hepática (Semple *et al.*, 2009), além de uma quantidade reduzida de gordura corporal em relação à quantidade esperada para o peso e altura deles (George *et al.*, 2004). Já os pacientes com hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica apresentavam hipoglicemia com concentrações séricas indetectáveis de insulina, acantose nigricans, hemihipertrofia corporal (Arya *et al.*, 2014) e características faciais distintas, convulsões por hipoglicemia (Hussain *et al*., 2004; Hussain *et al*., 2011) e polidrâmnio (Dushar *et al.*, 2021; Garg *et al*., 2015; Turnovec *et al.*, 2026). Durante a pesquisa, a variante presente no gene *AKT2* em cada uma dessas doenças foi associada à fisiopatologia de seus sintomas.
A variante *AKT2* c.821 G>A afeta o domínio proteína quinase da proteína, gerando uma alteração na conformação do segmento de ativação e da alça catalítica desse domínio e consequente desalinhamento do peptídeo-substrato em relação aos resíduos catalíticos e ao ATP (George *et al.*, 2004). Desse modo, essa variante gera perda de função da proteína AKT2, assim levando a proteína a não exercer corretamente a sua função. Logo, a proteína AKT2 mutante não participa da via de sinalização de insulina para que o transportador de glicose GLUT4 passe a se localizar na membrana plasmática das células (Arya *et al.,* 2014), assim justificando as altas concentrações séricas de glicose dos pacientes com lipodistrofia parcial familiar associada a *AKT2*. Ademais, a proteína mutante não participa da inibição da gliconeogênese hepática, permitindo que fatores de transcrição para esse processo que deveriam ser inativados pela atividade de AKT2, como o FOXO1, permaneçam mais tempo ativos e mais glicose seja produzida, aumentando ainda mais a glicemia desses pacientes (Semple *et al*., 2009). Vale salientar que a adipogênese e a inibição da lipólise também são comprometidas, assim justificando a

baixa quantidade de peso e de tecido adiposo das pessoas com esse tipo de lipodistrofia. A variante *AKT2* c.49 G>A afeta o domínio PH da proteína, hiperativando-o. Com isso, AKT2 exerce a sua função de forma exacerbada, sem a necessidade de ser ativado pela via de sinalização da insulina. Assim, independente dos níveis de insulina no sangue, a proteína AKT2 mutante ativa constantemente o processo que leva o transportador de glicose GLUT4 a se localizar por mais tempo na membrana plasmática das células (Gonzalez; Mcgraw, 2009), permitindo que mais glicose entre nelas e reduzindo a glicemia; o que justifica os quadros de hipoglicemia visto nos pacientes (Hussain *et al.*, 2011). Além disso, a proteína AKT2 mutante exacerba a inibição da gliconeogênese hepática, impedindo que mais glicose seja produzida e encaminhada para a corrente sanguínea, corroborando para o quadro de hipoglicemia. Ademais, a adipogênese é exacerbada, devido à AKT2 ficar constitutivamente ativa nos pré-adipócitos, levando-os a se diferenciarem com maior frequência (George *et al.*, 2004); a inibição da lipólise também é exacerbada (Arya *et al.*, 2014), uma vez que o fator de transcrição FOXO1 permanece fosforilado por AKT2 e, portanto, inativo, por mais tempo, não sendo capaz de transcrever genes importantes para a gliconeogênese hepática (O-Sullivan *et al*., 2014). A intensificação desses processos justifica os quadros de aumento de tecido adiposo visto nos pacientes com essa doença e denota uma das características antagônicas à lipodistrofia.

Ademais, a divulgação científica acerca das lipodistrofias e do metabolismo do tecido adiposo foi realizada semanalmente em forma de postagens publicadas no feed do perfil do *Instagram* @lipodistrofia.brasil e *quizzes* nos stories para fixação do conhecimento. Dessa maneira, as informações científicas foram fornecidas de maneira acessível e de linguagem de fácil entendimento para a comunidade externa à universidade, abrangendo pacientes lipodistróficos, familiares de pacientes, profissionais da área da saúde e outras pessoas interessadas no assunto.

No final do ano de 2025, um resumo intitulado "*Type 1 and 2 congenital generalized lipodystrophy individuals display a similar expression pattern of genes related to adipogenesis and DNA Repair*" foi apresentado em formato de pôster no XVII Congresso da Mutagen-Brasil.

Por fim, as informações obtidas na revisão de literatura também foram utilizadas para produzir um trabalho de conclusão de curso.

Conclusão

É válido ressaltar que os dados obtidos nessa revisão de literatura trouxeram mais clareza sobre as funções da proteína AKT2 e como mutações nela podem afetar o organismo, incluindo o entendimento sobre a fisiopatologia da lipodistrofia parcial familiar relacionada a *AKT2* e a hipoglicemia hipocetótica hipoinsulinêmica. Esses temas, agora mais claros, irão ajudar o grupo de pesquisa na comparação futura com dados de pacientes do grupo e a aprofundar o estudo sobre o tema. Além disso, o trabalho de conclusão de curso produzido a partir dos conhecimentos obtidos tem o objetivo de facilitar o reconhecimento dos sinais e sintomas e a compreensão da fisiopatologia dessas doenças, contribuindo para um diagnóstico mais fácil.

Ademais, o conhecimento científico sobre foi apresentado para a comunidade externa à universidade pelo *Instagram*@lipodistrofia.brasil e à comunidade científica no XVII

Congresso da Mutagen-Brasil, levando mais pessoas a conhecerem e se interessarem pelas lipodistrofias e pelo metabolismo do tecido adiposo.

Referências

ARAÚJO-VILAR, David; SANTINI, Ferruccio. Diagnosis and treatment of lipodystrophy: a step-by-step approach. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 42, n. 1, p. 61–73, 27 abr. 2018.

ARYA, Ved Bhushan *et al.* Activating AKT2 mutation: Hypoinsulinemic hypoketotic hypoglycemia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 2, 2014.

CAMPOS, Julliane Tamara Araújo de Melo *et al*. Endoplasmic reticulum stress and muscle dysfunction in congenital lipodystrophies. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2021.

CAMPOS, Julliane Tamara Araújo de Melo *et al*. DNA repair-related genes and adipogenesis: Lessons from congenital lipodystrophies. **Genetics and Molecular Biology**, v. 45, n. 3 suppl 1, 2022.

DUSHAR, Marya *et al*. Efficacy and safety of sirolimus therapy in familial hypoinsulinemic hypoglycemia caused by *AKT2* mutation inherited from the mosaic father. **European Journal of Medical Genetics**, v. 64, n. 12, p. 104368, 2021.

GARG, Nisha *et al*. MORFAN Syndrome: An Infantile Hypoinsulinemic Hypoketotic Hypoglycemia Due to an AKT2 Mutation. **The Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 2, p. 489–491, ago. 2015

GEORGE, Stella *et al.* A Family with Severe Insulin Resistance and Diabetes Due to a Mutation in *AKT2*. **Science**, v. 304, n. 5675, p. 1325–1328, 2004.

GONZALEZ, Eva; MCGRAW, Timothy E. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle**, 2009.

LIMA, Josivan Gomes et al. LIPODISTROFIAS DE BASE GENÉTICA: APRESENTAÇÃO CLÍNICA, DIAGNÓSTICO, COMORBIDADES E TRATAMENTO. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 31, n. 1, 2021.

MINIC, Marina *et al*. Constitutive Activation of AKT2 in Humans Leads to Hypoglycemia Without Fatty Liver or Metabolic Dyslipidemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 8, p. 2914–2921, 23 maio 2017.

MOLINA, Maria Fernanda Ochoa *et al*. Facial Dysmorphic Features in a Patient With Nonketotic Hypoglycemia and a Pathogenic Variant in the AKT2 Gene. **AACE Clinical Case Reports**, nov. 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **National Library of Medicine**. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em: 23 ago. 2026. Base de dados.

O-SULLIVAN, I. *et al.* FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. **Nature Communications,** v. 6, n. 1, 12 maio 2015.

SEMPLE, Robert K. *et al*. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. **Journal of Clinical Investigation,** 26 jan. 2009.

TURNOVEC, M. *et al.* A More Precise Description of the *AKT2* -Related Hypoinsulinemic Hypoglycemia and Overgrowth Syndrome Phenotype, Formerly

Described Under the MORFAN Acronym. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 2026.
UniProt. **UniProt**: the universal protein knowledgebase. Disponível em: https://www.uniprot.org/. Acesso em: 23 ago. 2026. Base de dados.
VIGOUROUX, C. *et al.* Molecular mechanisms of human lipodystrophies: From adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 6, p. 862–876, jun. 2011.
WELTERS, Alena *et al*. An expanded clinical spectrum of hypoinsulinaemic hypoketotic hypoglycaemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 18, n. 1, p. 360–360, 16 nov. 2023.

Anexos



Figura 1 - Capa de post do Instagram @lipodistrofia.brasil



Figura 2 - Página de uma postagem do Instagram @lipodistrofia.brasil



Figura 3 - Apresentação de pôster no XVII Congresso da Mutagen-Brasil



Figura 4 - Aluna Ana Carolina apresentando pôster no XVII Congresso da Mutagen-Brasil para um avaliador

CÓDIGO: SB0820

AUTOR: RENAN PORFÍRIO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: FERNANDO VAGNER LOBO LADD

TÍTULO: Caracterização Anatômica e Morfoquantitativa do Nervo Isquiático em saguis (Callithrix jacchus)

Resumo

O nervo isquiático é responsável pela inervação do membro pélvico, desempenhando importante papel na integração sensório-motora e na locomoção. Em primatas não humanos, sua caracterização contribui para a compreensão da organização do sistema nervoso periférico e da anatomia comparada. O objetivo foi descrever a origem, o trajeto, a distribuição e os aspectos morfoquantitativos do nervo isquiático em Callithrix jacchus. Trata-se de estudo anatômico original, aprovado pela CEUA-UFRN (Protocolo nº 018/2025; Certificado nº 439.018/2025), realizado em um sagui macho proveniente do Núcleo de Primatologia da UFRN. Foi realizada dissecação bilateral da região pélvica e dos membros pélvicos, com identificação do nervo desde sua origem no plexo lombossacral até a bifurcação nos nervos tibial e fibular comum, além de mensurações de comprimento e espessura. O nervo apresentou organização anatômica semelhante à observada em humanos, com participação predominante dos segmentos L2 a L5. Observou-se assimetria bilateral, com 8,5 cm de comprimento e 2 mm de espessura à esquerda, e 8,2 cm e 1,3 mm à direita. Conclui-se que o nervo isquiático mantém padrão anatômico conservado em C. jacchus, com variações morfoquantitativas possivelmente relacionadas à variabilidade individual. Apesar da análise de um único espécime, os achados contribuem para a caracterização anatômica da espécie.

Palavras-chave: Plexo lombossacral. Sistema nervoso periférico. Primatas não humanos

TITLE: Anatomical and Morphometric Characterization of the Sciatic Nerve in Marmosets (Callithrix jacchus)

Abstract

The sciatic nerve is responsible for the innervation of the pelvic limb, playing an important role in sensorimotor integration and locomotion. In non-human primates, its characterization contributes to the understanding of peripheral nervous system organization and comparative anatomy. This study aimed to describe the origin, course, distribution, and morphometric aspects of the sciatic nerve in Callithrix jacchus. This was an original anatomical study approved by the UFRN Ethics Committee on the Use

of Animals (CEUA-UFRN; Protocol No. 018/2025; Certificate No. 439.018/2025), conducted on one male marmoset from the UFRN Primatology Center. Bilateral dissection of the pelvic region and pelvic limbs was performed, identifying the nerve from its origin in the lumbosacral plexus to its division into the tibial and common fibular nerves, along with measurements of length and thickness. The nerve exhibited an anatomical organization similar to that observed in humans, with predominant contributions from spinal segments L2 to L5. Bilateral asymmetry was observed, with the left nerve measuring 8.5 cm in length and 2 mm in thickness, compared with 8.2 cm and 1.3 mm on the right. It is concluded that the sciatic nerve maintains a conserved anatomical pattern in C. jacchus, with morphometric variations possibly related to individual biological variability. Despite the analysis of a single specimen, these findings contribute to the anatomical characterization of the species.

Keywords: Lumbosacral plexus. Peripheral nervous system. Non-human primates.

Introdução

O nervo isquiático é responsável pela inervação do membro pélvico em

mamíferos, estando relacionado à integração sensório-motora e à locomoção. Em primatas não humanos, como o sagui (Callithrix jacchus), sua análise anatômica e morfoquantitativa contribui para a compreensão de características conservadas do sistema nervoso periférico e adaptações funcionais.

Metodologia

Estudo anatômico original, de abordagem morfoquantitativa, aprovado pela CEUA-UFRN (Protocolo nº 018/2025; Certificado nº 439.018/2025). Foi utilizado 1 sagui macho (Callithrix jacchus), proveniente do Núcleo de Primatologia da UFRN, sem realização de novos procedimentos invasivos. Realizou-se dissecação da região pélvica e dos membros pélvicos direito e esquerdo para identificação do nervo isquiático desde sua origem no plexo lombossacral, emergindo pela incisura isquiática maior, inferiormente ao músculo piriforme, seguindo profundamente aos músculos glúteos, posteriormente à articulação do quadril, percorrendo a face caudal da coxa entre a musculatura isquiotibial até sua bifurcação em nervos tibial e fibular comum, sendo realizadas mensurações bilaterais do comprimento e da espessura.

Resultados e Discussões

O nervo isquiático apresentou organização anatômica semelhante à descrita em humanos, originando-se do plexo lombossacral, com participação predominante dos segmentos L2 a L5. Observou-se assimetria bilateral, com o nervo esquerdo apresentando aproximadamente 8,5 cm de comprimento e 2 mm de espessura, enquanto o direito apresentou 8,2 cm e 1,3 mm.Conclusão: O nervo isquiático em sagui mantém

plano anatômico conservado entre mamíferos, apresentando variações morfoquantitativas possivelmente relacionadas à variabilidade biológica individual. Apesar da análise de apenas um espécime, o estudo contribui para a caracterização anatômica do nervo isquiático em primatas não humanos.

Conclusão

Os achados demonstram que o nervo isquiático em Callithrix jacchus apresenta uma organização anatômica amplamente conservada em relação a outros mamíferos, especialmente aos humanos, mantendo origem no plexo lombossacral, trajeto profundo na região glútea e distribuição terminal por meio dos nervos tibial e fibular comum. A análise morfoquantitativa evidenciou discreta assimetria bilateral nas medidas de comprimento e espessura, sugerindo variações anatômicas individuais que podem refletir a variabilidade biológica da espécie.Embora o estudo tenha sido realizado em um único espécime, os resultados fornecem dados anatômicos originais e relevantes para a caracterização do sistema nervoso periférico em primatas não humanos, ampliando o conhecimento morfológico sobre o sagui (Callithrix jacchus). Essas informações podem servir como base para futuras investigações morfométricas, histológicas e experimentais, além de contribuir para estudos de anatomia comparada, neurociência translacional e utilização do sagui como modelo em pesquisas biomédicas e pré-clínicas.

Referências

KUDO, N. et al. Distribution of Large and Small Dorsal Root Ganglion Neurons in Common Marmosets (Callithrix jacchus). Frontiers in Systems Neuroscience, v. 15, 2021. DOI: 10.3389/fnsys.2021.801492.

LOBO LADD, F. V.; LOBO LADD, A. A. B.; SILVA, A. A. P.; COPPI, A. A. Stereological and Allometric Studies on Neurons and Axo-Dendritic Synapses in Superior Cervical Ganglia. International Review of Cell and Molecular Biology, v. 311, p. 123–155, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-800179-0.00002-7.

LOESCH, A. et al. Stereological and Allometric Studies on Neurons and Axo-Dendritic Synapses in the Superior Cervical Ganglia of Rats, Capybaras and Horses. Cell and Tissue Research, v. 341, n. 2, p. 223–237, 2010. DOI: 10.1007/s004418.

CÓDIGO: SB0828

AUTOR: GIOVANA AZEVEDO BRAGA

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: Avaliação do fenótipo e genótipo de mulheres com síndrome de Ehlers-Danlos no Rio Grande do Norte

Resumo

A Síndrome de Ehlers-Danlos (SED) é uma desordem genética do tecido conjuntivo, subdividida em 13 subtipos, definidos com base em critérios clínicos e moleculares.O subtipo Hipermóvel é o único sem diagnóstico molecular, sendo definido por avaliação clínica. Além das manifestações clássicas, a SED pode apresentar comorbidades, como disautonomias e a síndrome de ativação mastocitária. Na região Nordeste, ainda são escassos os estudos sobre a SED. Este trabalho teve como objetivo aprofundar a compreensão da relação genótipo-fenótipo e avaliar o impacto da SED na qualidade de vida de pacientes do Rio Grande do Norte. Após aprovação pelo CEP/UFRN, o recrutamento ocorreu pelo Instagram(@ehlersdanlos.ufrn), sendo realizada a coleta de dados clínicos/genéticos dos pacientes, via questionário presencial e/ou online. Foram identificados 4 pacientes mulheres, com idade média de 46 anos. Nessas pacientes, observou-se um escorede Beighton médio 7 (± 2,7). Uma paciente apresentou o diagnóstico genético de SED Vascular, com a variante patogênica COL3A1 c.547G>A, associada à presença de múltiplos aneurismas, fadiga crônica, pele transparente e escoliose. Nas pacientes com subtipo Hipermóvel, observou-se elevada variabilidade fenotípica, como dor e fadiga crônica, além da presença de comorbidades. Os resultados evidenciaram uma importante diversidade fenotípica entre os pacientes e destacam a dificuldade relatada no processo de diagnóstico e no acesso a profissionais especializados.

Palavras-chave: Doenças raras. Síndrome de Ehlers-Danlos. Doença crônica

TITLE: Evaluation of the phenotype and genotype of women with Ehlers-Danlos syndrome in Rio Grande do Norte

Abstract

Ehlers-Danlos Syndrome (EDS) is a genetic connective tissue disorder subdivided into 13 subtypes, defined based on clinical and molecular criteria. The Hypermobile subtype is the only one lacking a molecular diagnostic marker, being defined instead through clinical assessment. In addition to classic manifestations, EDS can present with comorbidities such as dysautonomia and mast cell activation syndrome. Studies on EDS remain scarce in the Northeast region of Brazil. This study aimed to deepen the

understanding of the genotype-phenotype relationship and evaluate the impact of EDS on the quality of life of patients in Rio Grande do Norte. Following approval by the UFRN Research Ethics Committee (CEP/UFRN), patient recruitment was conducted via Instagram (@ehlersdanlos.ufrn), and clinical and genetic data were collected through in-person and/or online questionnaires. Four female patients were identified, with a mean age of 46 years. These patients exhibited a mean Beighton score of 7 (± 2.7). One patient had a genetic diagnosis of Vascular EDS, associated with the pathogenic variant *COL3A1* c.547G>A and presenting with multiple aneurysms, chronic fatigue, translucent skin, and scoliosis. Patients with the Hypermobile subtype showed high phenotypic variability—including chronic pain and fatigue—as well as the presence of comorbidities. The results demonstrated significant phenotypic diversity among the patients and highlighted the difficulties reported regarding the diagnostic

Keywords: Rare diseases. Ehlers-Danlos Syndrome. Chronic illness

Introdução

A Síndrome de Ehlers-Danlos (SED) é uma síndrome genética rara que afeta, principalmente, mas não de forma exclusiva, genes relacionados à produção e maturação da proteína colágeno, impedindo a correta formação da matriz extracelular do corpo do paciente. Os principais sintomas derivam da alteração dessa matriz, levando a hipermobilidade e instabilidade articular, fragilidade tecidual e aumento da capacidade de extensão do tecido cutâneo (MALFAIT et al., 2017). Apesar desses serem os sintomas mais perceptíveis e característicos da síndrome, os pacientes podem possuir múltiplas alterações, desde a presença de pápulas piezogênicas (herniação do tecido adiposo, presente no calcanhar, que passa a adentrar na camada da derme), até o desenvolvimento de aneurismas e dissecção da artéria aorta.

Por estar relacionada à principal proteína estrutural do organismo, a SED não se manifesta de maneira uniforme, apresentando uma ampla variabilidade clínica e expressividade variável entre os indivíduos afetados. Enquanto alguns pacientes manifestam apenas sinais leves de frouxidão ligamentar, como deslocamentos ou luxações parciais, outros enfrentam complicações sistêmicas graves que comprometem órgãos vitais e funções básicas do dia a dia. Essa natureza heterogênea fez com que, embora, atualmente, essas manifestações multissistêmicas sejam mais facilmente interligadas a um distúrbios do colágeno, o reconhecimento da Síndrome de Ehlers-Danlos como um diagnóstico diferencial demandou séculos de estudos e observações clínicas. Essa sutil linha divisória instigou médicos e pesquisadores ao longo das eras, moldando a trajetória de descobertas que culminaram na definição moderna da doença.

Atualmente, a síndrome é classificada em 13 subtipos (MALFAIT et al., 2017), possuindo um 14ª subtipo aceito por profissionais especialistas (BLACKBURN et al., 2018), contudo, ainda não presente no consenso internacional de diagnóstico da SED, já que o último consenso ocorreu no ano de 2017, prévio a descoberta desse novo subtipo chamado de Classical-like type 2, com previsão para uma nova classificação para o final de 2026. De forma geral, os subtipos são agrupados em 6 grupos , os quais resumem qual o mecanismo de alteração molecular que cada subtipo gera (MALFAIT et al., 2017). Apenas o subtipo hipermóvel, o qual por não possuir mecanismo molecular esclarecido não está incluído nos grupos.

Pela grande prevalência da SEDh em mulheres, cerca de 70% (DEMMLER et al, 2019), deve-se destacar os sintomas ginecológicos. Inicialmente, observa-se a piora dos sintomas da síndrome durante a puberdade, o período perimenstrual, a gravidez e o pós-parto, indicando uma clara correlação da flutuação dos níveis hormonais femininos com o aumento da hipermobilidade e instabilidade articular e de outros sintomas. Além da piora dos sintomas clássicos da síndrome, também observa-se prolapso de órgãos pélvicos, incontinência urinária, maior frequência de infertilidade, abortos espontâneos e em alguns casos relatados na literatura, ocorreu a ruptura precoce do saco amniótico, parto prematuro e falha na evolução do parto. A ocorrência de sintomas oculares é comum em todas as doenças do tecido conjuntivo, principalmente, o desenvolvimento de esclera azulada.

Metodologia

Para alcançar os objetivos propostos acima, foi organizada uma metodologia para a revisão de literatura e a avaliação dos pacientes com o diagnóstico de SED no RN, a qual será detalhada dos tópicos abaixo.

Para a execução da etapa prática do trabalho, com a avaliação de pacientes com o diagnóstico clínico e/ou genético da síndrome e que residem no Rio Grande do Norte, foi necessário a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Portanto, seguindo as normas dessa instituição, foi preenchida toda a documentação listada no site do CEP Central da UFRN (disponível em https://www.cep.propesq.ufrn.br/) e enviada para avaliação, por meio da Plataforma Brasil (disponível em https://plataformabrasil.saude.gov.br/login.jsf), conforme os requisitos necessários.

A primeira aprovação do projeto, contemplando apenas coleta de dados pessoais e clínicos, no formato presencial, ocorreu em 24/01/2025. Contudo, após parceria com a Associação Brasileira de Pessoas com Síndrome de Ehlers-Danlos e Transtornos do Espectro da Hipermobilidade (ABRASED), ampliamos a pesquisa para, também realizarmos a coleta de dados de forma online, visando atingir novos públicos de pacientes residentes no interior do Estado. Por conta disso, o projeto foi submetido novamente a análise com alterações, voltadas a essa nova metodologia, com a nova aprovação ocorrida em 20/08/2025, conforme número de aprovação 7.271.532.

Após a aprovação do trabalho pelo CEP Central da UFRN, foi realizado o convite de pacientes para a pesquisa por meio da identificação de pacientes pelo instagram @ehlersdanlos.ufrn. Essa identificação ocorreu, inicialmente, por meio da resposta em um formulário online com a indicação de interesse na participação da pesquisa. Com base nas respostas, inicialmente, entramos em contato com os pacientes que se enquadravam nos critérios de inclusão e que residiam na capital/região metropolitana, e os convidamos a assinar, de forma presencial o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a participar da pesquisa. Para um paciente ser convocado ela deveria ser mulher, apresentar o diagnóstico clínico e/ou genético da SED, ter mais de 18 anos e residir no estado do Rio Grande do Norte

A coleta de dados pessoais e clínicos desses pacientes ocorreu em 2 etapas. Primeiramente, os pacientes residentes na capital do estado foram chamados para assinatura do TCLE e coleta de dados de forma presencial no Laboratório de Genética Molecular e Metabolismo (LabGeM), localizado no Instituto de Medicina Tropical do Campus Central (IMT-RN) da UFRN. Após a recepção dos pacientes, foi explicado o motivo e os objetivos da pesquisa, além dos direitos garantidos pelo TCLE. Em seguida, os pacientes tiveram o tempo necessário para a leitura e assinatura do termo de consentimento, além de tirar dúvidas do processo. Os pacientes que assinaram o termo foram então expostos a um questionário, o qual visa a coleta de dados pessoais e clínicos. A resposta ao questionário era realizada de forma acompanhada pelo responsável da pesquisa, promovendo a orientação de resposta, sanando dúvidas e conferindo as respostas com base em exames e laudos médicos que os entrevistados possuíam. Após a resposta, os pacientes foram liberados.

Já as pacientes residentes das cidades do interior do estado, receberam, via email, depois da data 20/08/2025, conforme aprovação do CEP, a convocação para responder um questionário online, via Google Formulários, o qual incluía a leitura do TCLE, assinatura do mesmo e as perguntas também presentes no questionário físico.

Resultados e Discussões

A amostra analisada foi composta por 4 participantes, que cumpriam todos os pré-requisitos descritos na metodologia do trabalho. A média de idade foi de 46 anos (± 12,44), variando entre 31 e 59 anos. Outro valor temporal que avaliamos foi o tempo que os pacientes levaram para receber o diagnóstico clínico e/ou genético da síndrome. No que se refere à hipermobilidade articular, conforme o escore de Beighton, observou-se elevada frequência de escores compatíveis com hipermobilidade em adultos, maior ou igual a 5 pontos, sendo que 75% dos indivíduos da pesquisa apresentaram escore ≥5 na escala de Beighton. A média do escore foi de 7 (± 2,7).

Além disso, outros transtornos musculoesqueléticos mostraram-se presentes nos relatos sintomáticos dos pacientes avaliados. Foi observada a presença desse eixo de alteração em todas as 4 pacientes, em graus e formas distintas. O principal sintoma relatado são consequências da hipermobilidade articular, como deslocamento e subluxação de articulação, ruptura de tendões e ligamentos e lesões em outras estruturas articulares, como o menisco. Além disso, destacam-se complicações estruturais como escoliose, cifose e geno valgo, alterações como pé torto equinovaro e fragilidade óssea, como a osteoporose, associada a fraturas espontâneas, destacando, assim, diferentes graus de comprometimento biomecânico.

Sintomas dolorosos estiveram presentes em diferentes formas entre os pacientes analisados. Em destaque, 2 pacientes relataram com a maior intensidade esse sintoma, sendo que em um dos relatos, a dor foi descrita em associação a derrames articulares, lesão de menisco e episódios de rigidez corporal generalizada, enquanto em outro, o sintoma esteve relacionado a disfunções na articulação temporomandibular (ATM), cefaléia crônica e histórico de rupturas ligamentares. A presença de fadiga crônica também foi registrada concomitantemente aos quadros álgicos.

No quesito gastrointestinal, foram citados diversos sintomas que fazem parte do dia a dia dos pacientes, desde de sintomas associados a gastrite e refluxo esofágico, até possíveis motivos cirúrgicos, como divertículos intestinais. As pacientes relataram a constipação como um problema constante. Sintomas como estufamento, alteração do hábito intestinal (constipação ou diarreia) e dores abdominais após a alimentação foram associadas a diagnósticos como gastroparesia e síndrome do intestino irritável (SII). Outro tópico citado pelos pacientes foi a sensibilidade a múltiplos alimentos, principalmente à lactose e ao glúten.

No eixo psicológico e do neurodesenvolvimento, os pacientes relataram possuírem, além da SED, diagnósticos de depressão, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), compulsão alimentar, transtorno de atenção e hiperatividade (TDAH) e dislexia. Por fim, como comorbidades diagnosticadas, foram citadas: Fibromialgia, lipedema, Síndrome de Ativação Mastocitária (SAM), endometriose, artrite, cistite de repetição com cálculos renais, labirintite, asma, hipotensão postural, rosácea e osteoporose. De forma específica, 3 pacientes relataram alterações hormonais, duas pacientes com hipotireoidismo e outro paciente com hipogonadismo.

A caracterização genotípica dos pacientes evidenciou a presença de diferentes subtipos da Síndrome de Ehlers-Danlos na amostra analisada, demonstrando heterogeneidade quanto à classificação molecular e clínica, tendo sido descritos 3 subtipos distintos nos pacientes avaliados. Das 4 pacientes, 3 apresentavam o diagnóstico clínico do subtipo hipermóvel e outra paciente apresentava diagnóstico clínico e genético de SEDv. Na paciente com o subtipo vascular, foi detectada, por meio de análise de painel genético, mutação no gene associado à conformação estrutural do colágeno tipo III, cuja descrição específica encontra-se detalhada a seguir: COL3A1 c.547G>A (p.Gly183Ser). Essa variante classificada como patogênica, é causada pela alteração de 1 par de base, de guanina para adenina, na posição 547 do gene COL3A1, levando a uma alteração no códon de leitura, gerando, por consequência, a alteração do 183º da proteína, de uma glicina para uma serina. Por fim, para os pacientes classificados no subtipo hipermóvel, apenas 1 dos pacientes realizou de forma prévia o Painel Genético para SED, não sendo identificada nenhuma variante patogênica correlacionada aos sintomas descritos. A avaliação desses achados ocorreu por meio do laudo desses pacientes, não tendo sido realizado nenhum teste molecular no decorrer da nossa pesquisa.

A SED é uma doença que apresenta características fenotípicas variáveis, principalmente devido aos distintos fenótipos e aos múltiplos genes associados. Seu desenvolvimento é complexo e pouco explicado pelo genótipo, apresentando ampla variedade de manifestações sintomáticas bem como na cronologia destas. Trata-se de uma doença subdiagnosticada no Brasil, sendo este trabalho um dos primeiros a apresentar uma pesquisa de fenótipo e genótipo na região Nordeste do país. Portanto, a iniciativa deste trabalho aponta para sua extrema relevância no cenário das síndromes do tecido conjuntivo.

Em primeira visão, a SED pode ser falsamente determinada como apenas uma síndrome hipermóvel, com um fenótipo de grave hipermobilidade articular e um alto escore no teste de Beighton, contudo, apesar da hipermobilidade ser um sintoma importante para o diagnóstico, ela pode se apresentar de diferentes formas a depender do subtipo da síndrome, idade e gênero do paciente. Diante desse contexto, cabe discutir que o processo de envelhecimento está associado, de forma fisiológica, ao aumento da rigidez articular,

de modo que indivíduos com histórico de hipermobilidade articular na infância podem evoluir, ao longo do tempo, para quadros de maior enrijecimento dessas estruturas. Esse fenômeno é particularmente relevante na SED, especialmente no subtipo hipermóvel, no qual a expressão clínica da hipermobilidade tende a alterar ao longo da vida do paciente. Evidências demonstram que a hipermobilidade articular é mais prevalente na infância e apresenta redução progressiva com o avanço da idade, podendo ocorrer a regressão da pontuação do escore de Beighton em adultos previamente hipermóveis (SMITS-ENGELSMAN et al, 2011; GENSEMER C et al, 2021).

Nesse sentido, o relato da paciente que apresentou hipermobilidade na infância, mas atualmente possui escore de Beighton igual a 2, não necessariamente exclui a presença de um transtorno do espectro da hipermobilidade, mas pode refletir uma transição para fases clínicas posteriores da condição. Esse padrão vai de encontro ao analisado em estudos de evolução em fases da hipermobilidade, nas quais ocorre inicialmente um período de hipermobilidade acentuada, seguido por uma fase de dor e, posteriormente, uma fase de rigidez articular, associada à redução da amplitude de movimento (GENSEMER et al, 2021). Ademais, ressalta-se que o escore de Beighton apresenta limitações intrínsecas, incluindo a avaliação restrita a articulações específicas e seu caráter dicotômico, o que pode subestimar a hipermobilidade em indivíduos adultos ou naqueles com acometimento predominante de articulações não contempladas pelo escore (SMITS-ENGELSMAN et al, 2011).

Assim, a análise isolada do escore atual torna-se insuficiente para a caracterização clínica adequada, sendo fundamental a valorização da história pregressa de hipermobilidade, conforme já incorporado no critério diagnóstico mais recente, o que reforça a necessidade de uma abordagem longitudinal e integrada na avaliação desses pacientes.

Além do fator etário, torna-se relevante considerar as possíveis diferenças na expressão do fenótipo hipermóvel entre os sexos, uma vez que a literatura aponta uma maior prevalência e, frequentemente, maior expressividade clínica da hipermobilidade articular em pacientes com cromossomos XX. Tal distinção tem sido parcialmente atribuída à influência de hormônios sexuais, especialmente o estrogênio, sobre o tecido conjuntivo, incluindo efeitos na síntese, organização e remodelamento do colágeno (CASTORI, 2012; REMVIG et al., 2007). Esses fatores podem contribuir para uma maior amplitude de movimento articular e, consequentemente, para uma maior pontuação em instrumentos clínicos como o escore de Beighton em indivíduos do sexo feminino.

Adicionalmente, variações hormonais ao longo da vida, como aquelas relacionadas à puberdade, ciclo menstrual, gestação e menopausa, também estão associadas a alterações na estabilidade articular e a intensidade de sintomas associados, como dor musculoesquelética e fadiga, frequentemente descritos em pacientes com o subtipo hipermóvel da SED (ROMBAUT et al., 2010), situação essa que foi amplamente descrita na coorte analisada pelo nosso estudo. Apesar disso, embora tais associações sejam consistentes, os mecanismos biológicos desse fenômeno ainda não estão completamente desvendados, devendo-se considerar também a contribuição de fatores comportamentais e possíveis vieses diagnósticos, como maior procura por serviços de saúde por mulheres e maior reconhecimento clínico do fenótipo neste grupo.

Outros achados com uma vasta heterogeneidade fenotípica são os sintomas gastrointestinais, sendo esses achados consistentes com a literatura científica atual, a qual

descreve a ampla variabilidade na apresentação dos sintomas gastrointestinal em indivíduos com a síndrome, especialmente no subtipo hipermóvel, no qual queixas como dor abdominal, distensão abdominal, constipação e dismotilidade são frequentemente relatadas, porém sem um padrão clínico uniforme e sem uma base biológica com total compreensão (CASTORI, 2012).

A diversidade dessas manifestações pode ser inicialmente explicada pelo comprometimento direto do tecido conjuntivo presente na parede do trato gastrointestinal dos pacientes, o que pode interferir na motilidade, principalmente pela perda do controle muscular. No entanto, evidências atuais sugerem que esse envolvimento não se restringe a alterações estruturais, sendo também influenciado por disfunções do sistema nervoso autônomo, afetando assim, diretamente a função visceral. Nesse contexto, destaca-se a associação frequentemente descrita entre a SED e a Síndrome da Taquicardia Postural Ortostática, um dos subtipos da disautonomia, condição onde ocorre uma disfunção do sistema nervoso autônomo, alterando a função cardíaca, regulação da pressão e de forma mais específica no sistema gastrointestinal, a perfusão visceral e a regulação da motilidade gastrointestinal, contribuindo para o surgimento e a manutenção dos sintomas (FIKREE et al., 2017; DAYLOR, V. et al, 2025).

Adicionalmente ao exposto acima, tem sido descrita, na literatura, além da possível associação entre a SED e a disautonomia, outra condição, a SAM, também compõe um conjunto de condições frequentemente coexistentes em alguns pacientes. No contexto gastrointestinal essa associação torna-se ainda mais perceptível, pois além dos mecanismos patológicos da SED e da alteração do sistema nervoso autônomo, a ativação exacerbada e inadequada dos mastócitos, fenômeno ocorrido em pacientes com SAM, pode contribuir para o surgimento de sintomas como dor abdominal, diarreia, náuseas e hipersensibilidade visceral, por meio da liberação de mediadores inflamatórios que afetam tanto a motilidade quanto a permeabilidade intestinal (AFRIN, L. et al, 2015; LYONS, J. et al,2015), sintomas esses que estão frequentemente associados a pacientes com SED, tal qual os da coorte, contudo, que podem ser causados por uma variabilidade de condições clínicas.

Entretanto, é importante ressaltar que, apesar da recorrente descrição dessa associação, a relação entre essas condições ainda não está completamente elucidada, sendo alvo de debate na literatura, principalmente quanto à real existência dessa coexistência diagnóstica. Apesar disso, alguns autores sugerem que essa tríade pode refletir mecanismos fisiopatológicos compartilhados, enquanto outros apontam para a possibilidade de sobreposição diagnóstica ou viés de seleção em populações clínicas específicas (FIKREE et al., 2017).

No presente estudo, a variabilidade sintomática observada entre os pacientes, com sintomas variando desde intolerâncias alimentares até gastroparesia e SII, reforça esse perfil multifatorial e heterogêneo, sugerindo que a expressão dos sintomas gastrointestinais pode resultar da interação de múltiplos fatores, como estruturais, autonômicos e imunológicos, além de possíveis influências ambientais e outras alterações genéticas. Dessa forma, os achados vão de encontro à literatura ao evidenciar que o envolvimento gastrointestinal na SED é frequente, porém altamente variável e multifatorial, o que implica na existência de desafios diagnósticos, principalmente, associados na determinação correta da origem do sintoma, e terapêuticos. Reforçando, assim, a necessidade de uma abordagem clínica integrada, que considere não apenas

alterações estruturais, mas também aspectos funcionais, neuroautonômicos e imunológicos na avaliação desses pacientes.

Outro aspecto relevante a ser considerado refere-se ao impacto da SED sobre a saúde mental dos pacientes, o qual amplia as discussões relacionadas ao tema ao se inserir em um contexto mais amplo, com a observação da interação entre sistemas fisiológicos e psicossociais. A literatura aponta uma maior prevalência de sintomas ansiosos-depressivos em indivíduos com o subtipo hipermóvel, especialmente quando comparados à população geral (BAEZA-VELASCO et al., 2018; EICHINGER. et al, 2025; DAYLOR, V. et al, 2025), tal situação foi encontrada em nossos pacientes, contudo, com a descrição de sintomas depressivos-ansiosos, mas sem o diagnóstico formal das condições. Apesar disso, a discussão ainda torna-se válida, principalmente, por questionar a dificuldade encontrada por esses pacientes para uma correta abordagem terapêutica, incluíndo questões sociais e também as deficiências biológicas enfrentadas, uma vez que o aparecimento desses sintomas não deve ser compreendido como consequência isolada do enfrentamento de uma condição crônica ou unicamente do âmbito fisiopatológico da síndrome, mas sim como resultado de uma interação complexa entre dor persistente, disfunções autonômicas e possíveis alterações estruturais do sistema nervoso central.

Nesse sentido, a dor crônica, sintoma frequentemente relatada por pacientes com SED, desempenha papel central, não apenas como sintoma físico, mas como modulador de processos neurobiológicos associados à formação do humor e à cognição. A condição de persistência da dor está relacionada a fenômenos de sensibilização do eixo central da dor e alteração na modulação descendente da mesma, o que pode amplificar a percepção dos sintomas e contribuir para o desenvolvimento de quadros ansiosos e depressivos (CASTORI, 2012).

Em adição a isso, a participação do eixo intestino-cérebro surge como um novo componente fundamental na compreensão dessa interface, além de toda a sua importância no contexto gastrointestinal. Alterações na motilidade gastrointestinal, frequentemente descritas nesses pacientes, associadas a possíveis desequilíbrios na comunicação, que agora sabemos ser bidirecionais, entre sistema nervoso central e trato gastrointestinal, podem influenciar na expressão de moléculas, como a dopamina, gerando alterações tanto na via de percepção da dor quanto na organização do estado emocional. Esse eixo integra sinais neurais, hormonais e imunológicos, sendo potencialmente modulado por fatores como disbioses e ativação imune, o que amplia ainda mais a complexidade do quadro clínico (BAEZA-VELASCO et al., 2018; FIKREE et al., 2017).

Dessa forma, os achados reforçam que o comprometimento da saúde mental na Síndrome de Ehlers-Danlos não deve ser analisado de forma distinta entre os aspectos físicos e mentais, mas sim como parte de um sistema integrado, no qual as alterações estruturais, dor crônica, disautonomia e disfunções gastrointestinais interagem de maneira dinâmica influenciando na construção da saúde mental do paciente. Essa perspectiva não apenas contribui para uma compreensão mais abrangente da variabilidade fenotípica observada, mas também destaca a necessidade de abordagens clínicas multidisciplinares, capazes de contemplar simultaneamente os componentes biológicos, funcionais e psicossociais da doença.

Conclusão

A Síndrome de Ehlers-Danlos (SED) é uma síndrome genética rara e de elevada complexidade fenotípica, caracterizada principalmente pela tríade de hipermobilidade articular, fragilidade tecidual e hiperextensibilidade cutânea. Segundo a classificação internacional de 2017, a SED compreende 13 subtipos, com ampla variabilidade de manifestações clínicas e critérios diagnósticos. Embora dez subtipos sejam considerados ultrarraros, a prevalência da SED clássica, vascular e, especialmente, do subtipo hipermóvel permanece incerta, contribuindo para o subdiagnóstico e para atrasos no diagnóstico e manejo dos pacientes.

Essa problemática apresenta particular relevância para a saúde da mulher, considerando a complexidade e a variabilidade da apresentação clínica da SED e a necessidade de reconhecimento adequado da condição pelos profissionais de saúde. A ausência de conhecimento sobre a síndrome pode dificultar a identificação de manifestações clínicas e comprometer a assistência integral, reforçando a necessidade de uma abordagem multidisciplinar e qualificada.

Nesse contexto, o presente trabalho buscou contribuir para a caracterização clínica e molecular da SED no Rio Grande do Norte (RN), ampliando a compreensão da condição e seus impactos no cuidado em saúde. Durante três anos, foi realizado levantamento da literatura científica, seguido de um ano de coleta de dados clínicos e genéticos de pacientes da região. Os achados da coorte foram confrontados com os critérios diagnósticos vigentes e com dados da literatura.

Observou-se predomínio do subtipo hipermóvel, considerado o mais frequente, porém ainda sem dados epidemiológicos concretos. A identificação de outro genótipo na coorte também evidencia a possibilidade de subdiagnóstico de formas menos reconhecidas e potencialmente mais graves da síndrome na região. Esses resultados reforçam a importância da capacitação em genética médica e da ampliação do acesso a serviços especializados, especialmente no atendimento à população feminina, favorecendo o diagnóstico precoce, o manejo adequado e a integralidade do cuidado.

Apesar do reduzido tamanho da coorte e das limitações encontradas, o estudo fortalece as investigações regionais sobre doenças raras e amplia o conhecimento acerca da variabilidade fenotípica e genotípica da SED no RN, contribuindo para o aprimoramento da assistência e para futuras pesquisas voltadas à saúde da mulher.

Referências

AFRIN, L. B. et al. Mast cell activation disease: an underappreciated cause of neurologic and psychiatric symptoms and diseases. Brain, Behavior, and Immunity, Amsterdam, v. 50, p. 314-321, nov 2015. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.07.002. Disponível em:https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.002. Acesso em: 28 abr. 2026.

BAEZA-VELASCO, C. et al. Joint hypermobility syndrome: problems that require psychological intervention. Frontiers in Psychology, Lausanne, v. 31, p. 1131–1136 março 2011. DOI: 10.1007/s00296-011-1839-5. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00296-011-1839-5.Acesso em: 28 abr. 2026

BLACKBURN, P. R. et al. Bi-allelic alterations in AEBP1 lead to defective collagen assembly and connective tissue structure in Ehlers–Danlos syndrome. Nature Communications, [s. l.], vol. 102(4), pag. 696–705, abril 2018. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.02.018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.018. Acesso em: 28 abr. 2026

CASTORI, Marco. Ehlers-Danlos syndrome, hypermobility type: an underdiagnosed hereditary connective tissue disorder with mucocutaneous, articular, and systemic manifestations. ISRN Dermatology,[s. l.], v. 2012, p. 1–22, out. 2012. DOI:10.5402/2012/751768. Disponível em: https://doi.org/10.5402/2012/751768. Acesso em: 28 abr. 2026

DAYLOR, V. et al. Defining the Chronic Complexities of hEDS and HSD: A Global Survey of Diagnostic Challenges, Life-Long Comorbidities, and Unmet Needs. Journal of Clinical Medicine, [s. l.] v. 14(16), pag. 1-33, ago. 2025. DOI: 10.3390/jcm14165636. Disponível em: https://doi.org/10.3390/jcm14165636. Acesso em: 28 abr. 2026.

DEMMLER JC et al. Diagnosed prevalence of Ehlers-Danlos syndrome and hypermobility spectrum disorder in Wales, UK: a national electronic cohort study and case-control comparison. BMJ Open, [s. l.] v. 2019 Nov. doi: 10.1136/bmjopen-2019-031365. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6858200/. Acesso em: 28 abr. 2026.

EICHINGER, Josef K. et al. Orthopaedic Manifestations in Hypermobile Ehlers-Danlos Syndrome. The Journal of Bone and Joint Surgery,[s. l.], v. 107(16):p 1848-1856, jul. 2025. DOI: 10.2106/JBJS.24.01106. Disponível em: https://doi.org/10.2106/JBJS.24.01106. Acesso em: 28 abr. 2026.

FIKREE, A. et al. Gastrointestinal involvement in the Ehlers-Danlos syndromes. American Journal of Medical Genetics Part C, [s. l.], v. 175(1), pag. 181–187, fev. 2017. DOI: 10.1002/ajmg.c.31546. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31546. Acesso em: 28 abr. 2026.

GENSEMER C. et al. Hypermobile Ehlers-Danlos Syndrome: Complex phenotypes, challenging diagnoses, and poorly understood causes. Dev Dyn, [s. l.], v. 250(3); pag. 318-244, março, 2021. DOI: 10.1002/dvdy.220. Disponível em: https://doi.org/10.1002/dvdy.220. Acesso em: 28 abr. 2026.

LYONS, J. J. et al. Atopic dermatitis in children: clinical features, pathophysiology and treatment. Immunology and Allergy Clinics, [s. l.], vol. 35(1), pág. 161–183, fev. 2015. DOI: 10.1016/j.iac.2014.09.008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.09.008. Acesso em: 28 abr. 2026.

MALFAIT, F. et al. The 2017 international classification of the Ehlers–Danlos syndromes. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics,

[s. l.], v. 175, n. 1, p. 8-26, mar. 2017. DOI: 10.1002/ajmg.c.31552. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31552. Acesso em: 28 abr. 2026.

MALFAIT, F. et al. The Ehlers–Danlos syndromes. Nature Reviews Disease Primers, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1-22, jul. 2020. DOI: 10.1038/s41572-020-0194-9, Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41572-020-0194-9. Acesso em: 28 abr. 2026.

REMVIG, L. et al. Epidemiology of generalized joint hypermobility and basis for the proposed criteria. The Journal of Rheumatology, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 804–809, jan. 2007. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17407233/ . Acesso em: 7 abr. 2026.

ROMBAUT, L. et al. Musculoskeletal complaints, physical activity and health-related quality of life among patients with the Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type. Disability and Rehabilitation, [s. l.], v. 32, n. 16, p. 1339–1345, nov. 2009. DOI: 10.3109/09638280903514739. Disponível em: https://doi.org/10.3109/09638280903514739. Acesso em: 7 abr. 2026.

SMITS-ENGELSMAN B. et al. Beighton Score: A Valid Measure for Generalized Hypermobility in Children. The Journal of Pediatrics, [s. l.], vol. 158(1), pag. 119–123, jan. 2011. DOI: 10.1016/j.jpeds.2010.07.021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.07.021. Acesso em: 7 abr. 2026.

CÓDIGO: SB0830

AUTOR: LIGIA SAMIRA RODRIGUES COSTA

ORIENTADOR: VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do amido da semente de Artocarpus heterophyllus sobre medidas hematológicas e bioquímicas em ratas

Resumo

Tendo em vista recentes evidências sobre o potencial terapêutico do extrato da semente de jaca (Artocarpus heterophyllus) em algumas patologias, o presente estudo tem como objetivo avaliar a segurança biológica do amido da semente por meio da análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Como modelo experimental, utilizaram-se Ratas Wistar (n = 7 por grupo) distribuídas em grupo controle e grupos tratados com 250 mg e 500 mg do amido. A administração do tratamento não promoveu alterações significativas na maioria dos parâmetros avaliados, incluindo o leucograma, plaquetograma e perfil bioquímico (glicêmico, lipídico, renal e hepático; $p > 0,05$), indicando bom perfil de segurança sistêmica e ausência de interferência do ciclo estral. No entanto, observou-se uma redução estatisticamente significativa e dose-dependente na hemoglobina corpuscular média (HCM/HGM; $p = 0,0407$). Conclui-se que o amido de semente de jaca apresenta perfil favorável de segurança hepática, renal e metabólica nas doses testadas, exercendo impacto discreto e específico apenas sobre a síntese ou conteúdo de hemoglobina eritrocitária.

Palavras-chave: Amido de semente de jaca; Segurança; Hematologia; Bioquímica.

TITLE: Evaluation of the effects of Artocarpus heterophyllus seed starch on hematological and biochemical parameters in female rats.

Abstract

Given recent evidence regarding the therapeutic potential of jackfruit (Artocarpus heterophyllus) seed extract in certain pathologies, this study aims to evaluate the biological safety of the seed starch through the analysis of hematological and biochemical parameters. Female Wistar rats (n = 7 per group) were used as an experimental model, divided into a control group and groups treated with 250 mg and 500 mg of the starch. The administration of the treatment did not induce significant changes in most evaluated parameters, including the leukogram, platelet count, and biochemical profile (glycemic, lipid, renal, and hepatic; $p > 0.05$), indicating a good systemic safety profile and an absence of interference from the estrous cycle. However,

a statistically significant and dose-dependent reduction in mean corpuscular hemoglobin (MCH; p = 0.0407) was observed. It is concluded that jackfruit seed starch presents a favorable hepatic, renal, and metabolic safety profile at the tested doses, exerting a subtle and specific impact only on erythrocytic hemoglobin synthesis or content.

Keywords: Jackfruit seed starch; Safety; Hematology; Biochemistry.

Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, transtornos ansiosos e depressivos são os mais comumente encontrados no mundo, sendo mais diagnosticados em mulheres. A cada quatro pessoas acometidas por estas doenças, uma recebe tratamento adequado (OMS, 2024). A farmacoterapia da ansiedade e da depressão patológica apresenta desvantagens, como potencial de abuso, tolerância, alterações motoras, efeitos sedativos, alteração na arquitetura do sono e, para algumas classes, a grande latência para o efeito terapêutico ser observado (Dell'osso e Lader, 2013, Fanelli et al., 2022), o que tem levado à busca por novas alternativas terapêuticas para transtornos mentais. A jaca (Artocarpus heterophyllus Lam.) é uma fruta tropical consumida por várias pessoas em muitos países. As sementes de jaca contêm entre em torno de 60-80% de amido, sendo uma fonte sustentável para indústrias alimentícias e farmacêuticas (Kittipongpatana; Kittipongpatana, 2015). Neste contexto, poucos estudos foram realizados buscando investigar o perfil farmacológico deste amido, demonstrando efeitos hipoglicemiantes (Ajiboye et al., 2020) e sugerindo efeito sedativo em ratos (Ratnasooriya e Jayakody, 2002). Considerando este achado, torna-se interessante investigar o perfil ansiolítico e antidepressivo do amido extraído da semente de jaca em animais de laboratório. Como parte do mapeamento sobre a eficácia e segurança do uso do referido amido, torna-se imprescindível observar se o tratamento prolongado poderia alterar variáveis hematológicas e bioquímicas. Além dos dados científicos que serão aqui obtidos, este trabalho que será realizado por um(a) aluno(a) de iniciação científica da UFRN fortalecerá a pesquisa na Região Nordeste; ainda, a publicação dos dados aqui obtidos em periódico internacional aumentará a visibilidade da pesquisa brasileira e fortalecerá a produção científica nacional.

Metodologia

Animais: ratas Wistar fornecidas pelo Departamento de Biofísica e Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) com 90±10 dias de idade serão alojadas (4 por caixa) em caixas de polipropileno (41x34x18cm) e mantidas em ambiente com ciclo claro-escuro de 12h, umidade 70-80% e temperatura 23±1°C. Os animais terão acesso a ração padrão e a água a vontade. O projeto terá início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN. Esfregaços vaginais: esfregaços vaginais serão realizados dez dias anteriores aos testes comportamentais. As fêmeas serão submetidas ao procedimento de acordo com a técnica de citológica descrita por Marcondes e colaboradores (2002). O procedimento consistirá na lavagem do canal vaginal com o auxílio de uma pipeta plástica (pipeta de Pasteur) embebida em solução salina (NaCl 0,9%) introduzida suavemente (não profundamente). O fluido coletado será colocado em uma lâmina de vidro e corado com Azul de Metileno (0,004%) para posterior visualização em microscópio óptico (objetiva

10x). De acordo com a proporção de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos, as fases do ciclo estral serão divididas em proestro, estro, metaestro e diestro. Amido: A extração do amido da semente de jaca será realizada conforme Lawal et al. (2005) com adaptação. O amido será solubilizado em solução salina (NaCl 0,9%), que será utilizada nas ratas dos grupos tratados, já o grupo controle receberá apenas salina. O amido será administrado via oral durante 21 dias nas doses de 250 ou 500 mg/Kg com um volume de 1 mL/Kg conforme descrito por Ratnasooriya e Jayakody (2002). Testes comportamentais serão realizados em outro plano de trabalho e ao término dos teste os animais serão coletadas amostras de sangue, as quais serão processadas por centrifugação a 1500 xg/10 min para obtenção do soro. No soro serão determinados o perfil lipídico, incluindo a avaliação das concentrações de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos; a função renal por meio da avaliação das concentrações de ácido úrico, ureia e creatinina; a função hepática por meio da avaliação das concentrações de albumina, transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP); função cardíaca por meio da mensuração da isoformas da enzima creatinofosfoquinase. Para todas as análises serão utilizados kits (Kovalent + BioSys®, Rio de Janeiro). Análise estatística: os dados serão avaliados pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ou pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste de comparação em pares quando apropriado. O software GraphPad Prism 7 será utilizado para a análise dos dados. Será fixado um nível crítico de 5%, $p<0,05$.

Resultados e Discussões

EXAMES LABORATORIAIS 1.1. HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM) A hemoglobina corpuscular média (HCM), expressa em picogramas (pg), foi avaliada nos grupos controle, tratados com 250 mg e tratados com 500 mg, com 7 observações por grupo. Os valores médios observados foram de 20,54 ± 0,54 pg no grupo controle, 19,74 ± 0,47 pg no grupo tratado com 250 mg e 19,93 ± 0,42 pg no grupo tratado com 500 mg. Os dados apresentaram baixa dispersão entre os grupos, com amplitudes variando de 1,2 a 1,7 pg. Inicialmente, foi verificada a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk, que indicou normalidade em todos os grupos (controle: $p = 0,6233$; 250 mg: $p = 0,9537$; 500 mg: $p = 0,4860$). A homogeneidade das variâncias também foi confirmada pelos testes de Brown-Forsythe ($p = 0,9690$) e Bartlett ($p = 0,8449$), demonstrando que os pressupostos para aplicação da ANOVA paramétrica foram atendidos. A comparação entre os grupos por ANOVA de uma via revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias ($F(2,18) = 5,429$; $p = 0,0143$), com $R^2 = 0,3763$, indicando que aproximadamente 37,6% da variação total da HCM pode ser explicada pelo fator tratamento. Na análise post hoc pelo teste de Tukey, observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com 250 mg (diferença média = 0,8000 pg; IC95%: 0,1514 a 1,449; $p = 0,0146$), com redução da HCM no grupo tratado. Por outro lado, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com 500 mg ($p = 0,0651$), nem entre os grupos tratados com 250 mg e 500 mg ($p = 0,7487$). Esses resultados indicam que o tratamento na dose de 250 mg promoveu redução significativa da HCM em relação ao grupo controle, enquanto a dose de 500 mg não diferiu estatisticamente nem do controle nem da dose de 250 mg. Adicionalmente, a análise de correlação de Pearson demonstrou associação negativa moderada entre a dose e o HCM ($r = −0,45$; IC95%: −0,74 a −0,02; $p = 0,0407$), o que biologicamente sugere uma tendência de diminuição do HCM à medida que a dose do tratamento aumenta. De forma consistente, a regressão linear confirmou

essa relação dose-dependente (slope = −0,001229; R^2 = 0,20; p = 0,0407), indicando que, em média, cada aumento de 1 mg na dose está associado a uma redução aproximada de 0,001229 pg no HGM. Em conjunto, esses resultados indicam que o tratamento exerce efeito sobre o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos, com tendência de redução do HGM conforme a dose administrada aumenta. Em função das fases do ciclo estral, a hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentou, na análise descritiva, mediana e intervalo interquartil de 1,150 (1,006–1,519) no estro, 0,7750 (0,6750–1,000) no metaestro, 1,013 (0,7500–1,706) no diestro precoce, 0,5000 (0,5000–0,5000) no diestro tardio e 0,8250 (0,7250–0,9250) no proestro. De modo geral, observou-se variação descritiva dos valores de HCM em função do ciclo, com medianas numericamente mais elevadas no estro e no diestro precoce, e menores no metaestro, diestro tardio e proestro. A avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk mostrou distribuição normal nos grupos estro (W = 0,8993; p = 0,4274) e metaestro (W = 0,9071; p = 0,4501), enquanto o diestro precoce não apresentou distribuição normal (W = 0,5315; p < 0,0001). Para diestro tardio e proestro, o número de observações foi insuficiente para testar a normalidade. Considerando que os pressupostos de normalidade não foram atendidos em todos os grupos, a comparação da HCM em função das fases do ciclo estral foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as fases avaliadas (H = 7,261; p = 0,1227), indicando que, nesta amostra, a HCM não variou significativamente em função do ciclo estral. 1.2. DEMAIS EXAMES LABORATORIAIS Após a avaliação da distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, as variáveis com distribuição normal foram expressas como média ± desvio-padrão e analisadas por ANOVA, enquanto as variáveis sem distribuição normal foram apresentadas como mediana (intervalo interquartil) e comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise dos parâmetros hematológicos, plaquetários e bioquímicos não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a maior parte das variáveis avaliadas (p>0,05). No eritrograma, não foram observadas diferenças significativas para hemácias (HEM, 106/µL), hemoglobina (HGB, g/mL), hematócrito (HCT, %), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW-CV, %), reticulócitos em porcentagem (RET, %) e em valor absoluto (RET, 103/µL), volume globular médio (VGM, fL) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM, g/dL). No leucograma, também não houve diferença estatística para leucócitos totais (LEU, 103/µL), linfócitos em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), linfócitos reativos em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), monócitos em porcentagem e em valor absoluto (10^3/µL), neutrófilos segmentados em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), neutrófilos bastonetes em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), eosinófilos em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), bem como para os parâmetros plaquetários, incluindo plaquetas (PLQ, 103/µL), volume plaquetário médio (VPM, fL), platelet distribution width (PDW, %) e plaquetócrito (PCT, %). De maneira semelhante, entre os parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças significativas para glicose (mg/dL) F(2,18) = 0,5378; p = 0,5931; hemoglobina glicada (HbA1c, %), insulina (µU/mL), glicemia média estimada (mg/dL), índice HOMA-IR (adimensional), índice HOMA-β (adimensional), amilase (U/L), lipase (U/L), triglicerídeos (mg/dL) F(2,18) = 0,5255; p = 0,6001; colesterol total (mg/dL), HDL-c (mg/dL), LDL-c (mg/dL), VLDL-c (mg/dL) F(2,18) = 0,5378; p = 0,5931; colesterol não-HDL (mg/dL), índice de Castelli (adimensional), relação TG/HDL (adimensional), ureia (mg/dL) F(2,18) = 1,077; p = 0,3617; creatinina não compensada (mg/dL) H = 2,283; p = 0,3320; creatinina (mg/dL) F(2,18) = 0,1307; p = 0,8783; ácido úrico (mg/dL) H = 0,4254; p = 0,8181; cálcio (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), bilirrubina direta (mg/dL), bilirrubina indireta (mg/dL), proteínas totais

(g/dL) F(2,18) = 0,3990; p = 0,6768; albumina (g/dL), globulinas (g/dL), TGO (U/L) F(2,18) = 0,07212; p = 0,9307; TGP (U/L) F(2,18) = 0,2213; p = 0,8037; índice de Ritis (adimensional): Brown-Forsythe ANOVA: F(2,000; 10,50) = 1,132; p = 0,3588; GGT (U/L) F(2,18) = 0,05151; p = 0,9499; FAL (U/L), tempo de protrombina (s) e LDH (U/L) F(2,18) = 0,05151; p = 0,9499. O único parâmetro que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi a hemoglobina globular média (HGM, pg), cujo resultado foi descrito separadamente. Foram excluídos da análise, devido à ausência de valores, os parâmetros metamielócitos em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), mielócitos em porcentagem e em valor absoluto (103/µL), basófilos em porcentagem e em valor absoluto (103/µL) e eosinófilos em valor absoluto (103/µL).

Conclusão

O tratamento avaliado demonstrou ser predominantemente seguro para os sistemas hematológico e bioquímico nas doses testadas (250 mg e 500 mg), sem induzir alterações significativas na maioria dos parâmetros sanguíneos, hepáticos, renas ou metabólicos, tampouco sofrendo influência das fases do ciclo estral. Contudo, observou-se efeito específico sobre a série vermelha, caracterizado pela redução dose-dependente da hemoglobina corpuscular média (HCM/HGM), sugerindo que a intervenção interfere no conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos.

Referências

Ajiboye BO, Ojo OA, Oyinloye BE, Okesola MA, Oluwatosin A, Boligon AA, Kappo AP. Investigation of the In Vitro Antioxidant Potential Of Polyphenolic-Rich Extract of Artocarpus heterophyllus Lam Stem Bark and Its Antidiabetic Activity In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Evid Based Integr Med. Jan-Dec;25:2515690X20916123, 2020. Alonso J, Liu Z, Evans-Lacko S, et al. Treatment gap for anxiety disorders is global: results of the World Mental Health Surveys in 21 countries. Depress Anxiety. 2018;35(3):195–208. doi:10.1002/da.22711. APA - American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5-TR. 5.ed., texto revisado. Porto Alegre: Artmed, 2023. Dell'osso B, Lader M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. Eur Psychiatry. 2013 Jan;28(1):7-20. doi: 10.1016/j.eurpsy.2011.11.003. Fanelli G, Serretti A. Depression, antidepressants, and insulin resistance: which link? Eur Neuropsychopharmacol 60:4–6, 2022. GBD Results Tool. In: Global Health Data Exchange [website]. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation; 2019 (https://vizhub.healthdata.org/gbd-results?params=gbd-api-2019-permalink/716f37e05d94046d6a06c1194a8eb0c9, accessed 5 September 2023). Kittipongpatana, O. S.; Kittipongpatana, N. Resistant starch contents of native and heat-moisture treated jackfruit seed starch. Scientific World Journal, v. 2015. Lawal, O. S.; Adebowale, K. O. Physicochemical characteristics and thermal properties of chemically modified jack bean (Canavalia ensiformis) starch. Carbohydrate Polymers, v.60, n.3, p.331-341, 2005. Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J.; Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Brazilian Journal of Biology, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 1 nov. 2002. OMS, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders, acessado em 03 de julho de 2024. Ratnasooriya WD,

Jayakody JR. Artocarpus heterophyllus seeds inhibits sexual competence but not fertility of male rats. Indian J Exp Biol. Mar;40(3):304-8, 2002.

CÓDIGO: SB0833

AUTOR: NICOLE KAUYSA DA SILVA

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: Como a metodologia de extração pode afetar a avaliação de riqueza e diversidade de FMA na serapilheira?

Resumo

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA-Glomeromycota) desempenham um papel fundamental na dinâmica solo-planta, porém, os trabalhos com FMA na serapilheira ainda carecem de padronização metodológica para avaliação de sua biodiversidade. Este estudo avaliou como diferentes gramaturas (20 g e 30 g) em diferentes tratamentos (serapilheira inteira e triturada) influenciam na recuperação de esporos, riqueza de espécies e índices de diversidade. O material foi coletado no Parque Estadual Dunas de Natal (Natal/RN) e processado via técnica de peneiramento úmido adaptada. Foram identificadas 19 espécies de FMA distribuídas em seis famílias e seis gêneros. O tratamento triturado recuperou 14 espécies (8 exclusivas), enquanto a serapilheira inteira apresentou 11 espécies (5 exclusivas), compartilhando 6 táxons. A serapilheira triturada de 30 g obteve os maiores índices de diversidade, além do maior valor de equitabilidade. Apesar das variações nominais observadas, o teste-t de Hutcheson indicou que as diferenças não foram estatisticamente significativas. Conclui-se que a trituração associada a maiores gramaturas otimiza a estimativa da diversidade estrutural da comunidade, embora um maior esforço amostral seja necessário para consolidar os padrões metodológicos, a serapilheira abriga uma relevante diversidade de FMA.

Palavras-chave: FMA, serapilheira, diversidade, Glomeromycota, metodologia, extração.

TITLE: How can the extraction methodology affect the assessment of AMF richness and diversity in leaf litter?

Abstract

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF-Glomeromycota) play a fundamental role in soil-plant dynamics, however, work with AMF in litter still lacks methodological standardization to evaluate their biodiversity. This study evaluated how different

weights (20 g and 30 g) in different treatments (whole and crushed thrush) influence the recovery of spores, species richness and diversity indices. The material was collected at the Parque das Dunas (Natal/RN) and processed via adapted wet sieving technique. 19 species of FMA distributed in six families and six genera were identified. The crushed treatment recovered 14 species (8 exclusive), while the entire litter presented 11 species (5 exclusive), sharing 6 taxa. The 30 g crushed litter obtained the highest diversity indices, in addition to the highest fairness value. Despite the nominal variations observed, Hutcheson's t-test indicated that the differences were not statistically significant. It is concluded that the grinding associated with higher weights optimizes the estimation of the structural diversity of the community, although a greater sampling effort is necessary to consolidate the methodological standards, the litter houses a relevant diversity of AMF.

Keywords: AMF, leaf litter, diversity, Glomeromycota, methodology, extraction.

Introdução

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota, são componentes essenciais do sistema solo-planta, apresentando estreita relação com a diversidade e a produtividade das comunidades vegetais, e com uma biomassa estimada em mais de 300 megatoneladas, equivalente a cerca de quatro a seis vezes a biomassa total humana (Stewart et al. 2026). Atualmente, o filo é constituído por três classes, nove ordens, 25 famílias e 57 gêneros (Wijayawardene et al. 2025). Tais organismos são de distribuição cosmopolita e estabelecem uma simbiose mutualística denominada micorriza arbuscular com aproximadamente 72% das plantas terrestres (Souza et al. 2008; Smith & Read, 2010; Brundrett & Tedersoo, 2018). Nesta simbiose, a planta fornece fotossintatos necessários para o crescimento e reprodução do fungo, enquanto o fungo disponibiliza diversos benefícios ao seu hospedeiro, como auxílio na absorção de nutrientes do solo e aumento da tolerância contra patógenos (Souza et al. 2008).

Apesar de serem conhecidos como simbiontes obrigatórios com raízes vegetais, os FMA são capazes de colonizar a serapilheira (Aristizábal et al. 2004; Bunn et al. 2019; Díaz-Ariza et al. 2021; Lima et al. 2025). Bunn et al. 2019 defenderam a hipótese de que esses fungos podem estar envolvidos na transferência de nutrientes liberados pela decomposição de folhas para plantas hospedeiras, uma vez que os fungos micorrízicos são capazes de liberar compostos químicos derivados do carbono da planta hospedeira que estimulam metabolicamente microrganismos saprófitos, acelerando a sua atividade decomposição da matéria orgânica (Choreño-Parra & Treseder, 2024). Foi relatado que os FMA preferencialmente desenvolvem hifas na serapilheira, absorvendo e transferindo nutrientes não apenas do solo, mas também da serapilheira (Hodge et al. 2001, Lima et al. 2025). Ademais, a presença de esporos de FMA na serapilheira demonstra potencial para importantes implicações na ecologia de dispersão deste grupo (Kemmelmeier et al. 2022).

Todavia, informações taxonômicas, aspectos ecológicos e metodológicos acerca dos FMA na serapilheira permanecem limitados, ocasionando um obstáculo significativo sobre o papel dos FMA na decomposição e na transferência de nutrientes da serapilheira (Lima et al. 2024). Lima et al. 2025 sugerem que a serapilheira é um habitat promissor que pode abrigar uma diversidade ainda inexplorada de FMA, incluindo espécies raras ou até ausentes no solo, entretanto, a escassez de dados limita a estimativa da sua diversidade. Portanto, existe uma lacuna de conhecimento evidente acerca de diversos aspectos, incluindo como diferentes metodologias de extração podem influenciar a riqueza e diversidade de FMA na serapilheira.

Metodologia

Área de coleta

As coletas foram executadas no Parque Estadual Dunas de Natal (Natal/RN), unidade de conservação com 1.172 hectares voltada à proteção de um fragmento remanescente de Mata Atlântica (IDEMA, 2026). A flora local é marcada pela predominância de espécies das famílias Anacardiaceae, Bignoniaceae, Myrtaceae, Fabaceae e Rubiaceae (Goto et al. 2012).

A amostragem da serapilheira mista ocorreu diretamente sob a projeção da copa de árvores adultas, distribuída em cinco pontos distanciados entre si por cerca de 5 metros. Em cada ponto, foi estabelecido uma parcela de 1x1 m para a remoção do material. Posteriormente, as folhas coletadas foram submetidas a diferentes tratamentos e triagem específicas para cada teste experimental (Figura 1).

Extração de esporos

Os esporos de FMA foram extraídos da serapilheira por meio de uma adaptação da técnica de peneiramento úmido, proposta por Gerdemann & Nicolson (1963) . Nesta adaptação, a serapilheira foi agitada em um béquer contendo aproximadamente 1.800 mL de água e mantida em repouso por cerca de 40 segundos para decantação. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em peneiras granulométricas de 710, 150 e 45 µm e transferido para tubos de centrifugação. Esse procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se solução de sacarose a 70%. Realizou-se uma nova centrifugação a 1.000 rpm por 1 minuto. Ao final, o conteúdo dos tubos foi filtrado na peneira de 45 µm para retenção dos esporos, recuperados por lavagem com água e armazenados em tubos do tipo falcon e depois transportados para placas de Petri (Figura 2).

Para a extração, o material foi previamente dividido em dois tratamentos: serapilheira triturada e serapilheira composta por folhas inteiras. Em ambos,

foram avaliadas duas gramaturas, 20 g e 30 g, sendo a última correspondente à gramatura padrão adotada na metodologia original.

a) Serapilheira triturada

A serapilheira foi triturada com o auxílio de um liquidificador doméstico e submetida ao processo de extração utilizando-se as gramaturas de 20 g e 30 g. Para cada gramatura, foram realizadas três repetições em cada um dos três pontos amostrais, totalizando 18 extrações destinadas à avaliação comparativa do efeito das diferentes gramaturas sobre a eficiência do método.

b) Serapilheira inteira

As folhas inteiras foram submetidas ao mesmo procedimento de extração, utilizando-se as gramaturas de 20 g e 30 g, com três repetições para cada um dos três pontos amostrais. Ao final dessa etapa, foram obtidas 18 extrações. Dessa forma, considerando ambos os tratamentos, o experimento 36 extrações, possibilitando a comparação entre a serapilheira triturada e a serapilheira com folhas inteiras quanto à eficiência de recuperação de esporos de FMA.

Montagem de lâminas e identificação taxonômica

Para a identificação das espécies de FMA, os esporos foram inicialmente separados por morfotipos considerando tamanho, cor e forma. Posteriormente, foram montados em lâminas utilizando uma mistura de PVLG (álcool polivinílico + ácido lático + fenol) e reagente de Melzer (1:1 v/v). Os espécimes foram identificados por meio da observação de características morfológicas, como a espessura e o número de camadas da parede do esporo, o fenótipo das camadas presentes e a alteração histoquímica destas no reagente de Melzer (Medeiros et al. 2021). Tais características foram comparadas com as chaves de identificação morfológica para Glomeromycota compiladas por Błaszkowski (2012) e com nomenclatura de táxons atualizada conforme a classificação de Wijayawardene et al. (2025).

Análises de diversidade e estatística

Após a identificação dos táxons de FMA, foram realizadas análises ecológicas para obter a riqueza estimada de espécies, índices de diversidade de Shannon (H') e de Simpson (D; matematicamente expresso como 1-D) e de equitabilidade de Pielou (J) entre as diferentes metodologias executadas. Para avaliar a possibilidade de diferença estatística significativa entre as comunidades de FMA em relação a sua biodiversidade na serapilheira, foi realizado o teste-t de Hutcheson (Hutcheson, 1970) com nível de significância $\alpha = 0,05$. As análises foram executadas com auxílio dos softwares Jamovi versão 2.7.38 (Jamovi, 2026) e R versão 4.3.1 (R Core Team, 2026).

Resultados e Discussões

Foram identificadas 19 espécies de FMA pertencentes a seis famílias e seis gêneros (Tabela 1). As famílias mais abundantes encontradas na serapilheira nos dois tratamentos foram Glomeraceae e Acaulosporaceae com oito e seis espécies, respectivamente. Os gêneros mais abundantes, por sua vez, foram *Glomus*, seguido de *Acaulospora*. Nas amostras de serapilheira compostas por folhas inteiras foram recuperadas 11 espécies, sendo cinco exclusivas: *Glomus brohultii, Glomus sp. glomerulatum, Acaulospora ignota, Septoglomus sp.* e *Fuscutata heterogama*; enquanto que a serapilheira triturada apresentou 14 espécies, nas quais oito foram exclusivas desse tratamento, especificamente *Glomus glomerulatum, Glomus sp. herrerae, Acaulosporafoveata, Acaulospora lacunosa, Acaulospora reducta, Acaulospora sp. morrowiae, Gigaspora decipiens* e *Dominikia sp. aurea*. Já as espécies compartilhadas foram identificadas como *Glomus sp., Glomus sp. trufemii, Glomus sp. brohultii, Glomus spinuliferum, Acaulospora sp.* e *Gigaspora sp.* Entre estes, o mais abundante foi *Glomus sp. trufemii* (Figura 3).

A amostra triturada com 20 g foi a mais rica (S = 10) e a mais abundante em número de esporos (N = 27), sugerindo que tal condição amostral pode ter favorecido a recuperação de esporos de FMA no substrato. No entanto, o seu índice de equitabilidade de Pielou (J = 0,77) sofreu uma limitação direta devido à alta dominância de *Glomus sp. trufemii*, responsável por 48,1% do total de esporos. Em contraposição, a amostra triturada com 30 g apresentou os maiores índices de diversidade de Shannon (H’ = 1,89) e de Simpson (D = 0,82). Além da sua elevada equitabilidade (J = 0,91) que reflete uma distribuição quantitativa consideravelmente mais uniforme entre as 8 espécies listadas, com ausência de uma sobreposição desproporcional de um único morfotipo (Tabela 2). Apesar de tais distinções nominais, a aplicação do teste-t de Hutcheson mostrou que a variação na diversidade entre as duas gramaturas não foi significativa (t = 0,43; p = 0,66). Por outro lado, a amostra de serapilheira inteira de 20 g obteve os menores índices de diversidade (H’ = 1,22; D = 0,54. Devido à alta dominância de *Glomus sp. trufemii* (equivalente a 66,7% dos esporos recuperados no tratamento). Ao contrastar este extremo de menor diversidade com o tratamento mais equitativo (triturada 30 g), o teste- t de Hutcheson mostrou uma tendência de significância (t = 2,01; p = 0,052) (Tabela 3). De modo geral, os resultados mostram que o acréscimo na gramatura na serapilheira triturada, provavelmente, amenizou os efeitos de dominância de espécies, promovendo uma estimativa mais equilibrada da diversidade das comunidades de FMA associadas à serapilheira. Contudo, a ausência de diferenças estatísticas consolidadas ao nível de α = 0,05 sugere que a alta variabilidade natural aliada ao baixo quantitativo total de esporos limitou o poder da análise, indicando que um maior esforço amostral poderia ser capaz de confirmar essas divergências (Figura 4).

Conclusão

O presente trabalho permitiu avaliar a influência da gramatura sobre a eficiência da recuperação de esporos na serapilheira previamente triturada e não triturada. Foi evidenciado a relevância da serapilheira para a diversidade de FMA, identificando 19 espécies, em sua maioria pertencentes ao gênero *Glomus,* e demonstrando que o uso de amostras trituradas de maior gramatura (30 g) reduz a dominância e melhora os índices de diversidade. Porém, a ausência de significância estatística consolidada sinaliza a necessidade de maior esforço amostral para a consolidação dos parâmetros metodológicos de extração dos FMA no substrato.

Referências

Aristizábal, C.; Rivera, E. L.; Janos, D. P. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize decomposing leaves of Myrica parvifolia, M. pubescens and Paepalanthus sp. Mycorrhiza, v. 14, p. 221–228, 2004.

Błaszkowski, J. (2012). Glomeromycota (pp. 303-pp).

Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. New Phytologist, 220(4), 1108-1115.

Bunn, R. A., Simpson, D. T., Bullington, L. S., Lekberg, Y., & Janos, D. P. (2019). Revisiting the 'direct mineral cycling'hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why?. The ISME journal, 13(8), 1891-1898.

Choreño-Parra, E. M., & Treseder, K. K. (2024). Mycorrhizal fungi modify decomposition: a meta-analysis. New Phytologist, 242(6), 2763-2774.

Díaz-Ariza, L. A., Rivera, E. L., & Sánchez, N. (2021). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in leaf litter and roots of shaded coffee plantations under organic and conventional management. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 45, e0200110.

Gerdemann, J. W.; Nicolson, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society, v. 46, n. 2, p. 235–244, 1963.

Goto, B. T. et al. Glomus trufemii (Glomeromycetes), a new sporocarpic species from Brazilian sand dunes. Mycotaxon, v. 120, n. 1, p. 1–9, 2012.

Hodge, A., Campbell, C. D., & Fitter, A. H. (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. Nature, 413(6853), 297-299.

Hutcheson, K. (1970). A test for comparing diversities based on Shannon formula. Journal of theoretical Biology, 29, 151-154.

Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. Parque Estadual Dunas do Natal. IDEMA. Disponível em https://www.idema.rn.gov.br/postagem/parque-estadual-dunas-do-natal/. Acesso em: 6 de junho de 2026.

Jamovi: open statistical software. Disponível em: https://www.jamovi.org/. Acesso em: 10 junho de 2026.

Kemmelmeier, K., dos Santos, D.A., Grittz, G.S., Stürmer, S.L. (2022). Composition and seasonal variation of the arbuscular mycorrhizal fungi spore community in litter, root mat, and soil from a subtropical rain forest. Mycorrhiza, 32, 409-423.

Lima, J. L. R. D., Felix, J. R. B., Vieira, H. D. S., Nobre, C. P., Leroy, J. A. S., Fiuza, P. O., & Goto, B. T. (2024). Recovering arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from decomposing litter: an unusual approach. New Zealand Journal of Botany, 62(4), 609-625.

Lima, J. L. R., Magurno, F., Nobre, C. P., Uszok, S., Marinho, P., Fiuza, P. O., & Goto, B. T. (2025). Climbing to the top: how arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter. Mycological Progress, 24(1), 79.

Medeiros, A. S., Goto, B. T., & Ganade, G. (2021). Ecological restoration methods influence the structure of arbuscular mycorrhizal fungal communities in degraded drylands. Pedobiologia, 84, 150690.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2026. Disponível em: https://www.r-project.org.. Acesso em: 05 de junho de 2026.

Smith, Sally E.; Read, David J. Mycorrhizal symbiosis. Academic press, 2010.

Souza, F. A.; Silva, ICL da; Berbara, R. L. L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p. 483-536, 2008.

Stewart, J. D., et al. (2026). Global density and biomass of arbuscular mycorrhizal fungal networks. Science, 392, 1171–1176. https://doi.org/10.1126/science.adu4373

Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Mikhailov, K. V., Goto, B. T., Santiago, A. L. D. A., Tokarev, Y. S., ... & Radek, R. (2025). Families of non-Dikarya fungi. Mycosphere, 16, 4063-4445.

Anexos



FIGURA 1 - Fluxograma esquemático da metodologia aplicada para o desenvolvimento do trabalho.



FIGURA 2 - Ilustração das etapas da extração de esporos via peneiramento úmido, adaptação da técnica sugerida por Gerdemann & Nicolson (1963).



FIGURA 3 - Diagrama de Venn indicando o número e espécies de FMA exclusivos e compartilhados entre a serapilheira inteira e a serapilheira triturada.



FIGURA 4 - Índices de diversidade de Shannon (H') das comunidades de FMA em diferentes condições de tratamento. Colunas com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste-t de Hutcheson ($p > 0,05$).



TABELA 1 - Relação das espécies encontradas nas amostragens de serapilheira com suas respectivas famílias.



TABELA 2 - Relação dos tratamentos com os seus valores de riqueza e índices de diversidade.



TABELA 3 - Valores de p obtidos pelo teste-t de Hutcheson para a comparação pareada dos índices de diversidade entre os diferentes tratamentos.

CÓDIGO: SB0840

AUTOR: GUILHERME SOUZA SITKAUSKAS

COAUTOR: REBECA GOMES SOARES

COAUTOR: RAONE BELTRÃO MENDES

ORIENTADOR: MIRIAM PLAZA PINTO

TÍTULO: Estudo fenológico de plantas arbóreas em fragmentos de Mata Atlântica nordestina com ocorrência de Alouatta belzebul

Resumo

Este relatório de iniciação científica investigou a fenologia da vegetação arbórea na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, especificamente no Centro de Endemismo de Pernambuco (CEP), uma região fragmentada. O estudo visou compreender a disponibilidade de recursos para o guariba-de-mãos-ruivas (Alouatta belzebul), um primata Neotropical classificado como Vulnerável. Realizado na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Gargaú, e na Reserva Biológica (REBIO) Guaribas, Paraíba, dois fragmentos florestais cercados por monocultura de cana-de-açúcar, o estudo monitorou mensalmente (fevereiro/2025 a junho/2026) 292 indivíduos arbóreos sabidamente presentes na dieta de A. belzebul, com DAP ≥ 10 cm em 15 parcelas. Foram registradas presença e intensidade de folhas novas, folhas maduras, floração e frutificação, utilizando o índice de Fournier. Os resultados mostraram que enquanto as folhas maduras se mantiveram constantes ao longo do ano, a emissão de folhas novas foi mais intensa em novembro e dezembro. A floração teve seu auge em fevereiro e a frutificação em março, sequencial à floração. Espécies como Xylopia frutescens e Himatanthus phagedaenicus foram observadas. Estes achados são cruciais para entender estratégias ecológicas em ambientes fragmentados e avaliar a disponibilidade de recursos para o Alouatta belzebul, auxiliando na conservação da flora nativa do CEP.

Palavras-chave: Fenologia.Mata Atlântica.Alouatta belzebul.Fragmentação.Sazionalidade

TITLE: Phenological Study of Tree Species in Northeastern Atlantic Forest Fragments Inhabited by Alouatta belzebul

Abstract

This scientific initiation research investigated the phenology of tree vegetation in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil, specifically in the Pernambuco Endemism Center (CEP), a highly fragmented region. The study aimed to understand resource availability for the Vulnerable Neotropical primate Alouatta belzebul. The study was conducted in two forest fragments surrounded by sugarcane monocultures in Paraíba, Brazil: Gargaú Private Natural Heritage Reserve (RPPN) and Guaribas Biological Reserve (REBIO). From February 2025 to June 2026, 292 trees known to be part of the diet of A. belzebul, with DBH ≥ 10 cm, were monitored monthly across 15 plots. The presence and intensity of young and mature leaves, flowering, and fruiting were recorded using the Fournier index. Mature leaves remained relatively constant throughout the year, while young leaf production was more intense in November and December. Flowering peaked in February, followed by fruiting in March. Species such as Xylopia frutescens and Himatanthus phagedaenicus were recorded. These findings contribute to understanding ecological strategies in fragmented environments and resource availability for A. belzebul, supporting the conservation of native flora in the CEP.

Keywords: Phenology.Atlantic Forest.Alouatta belzebul.Fragmentation.Seasonality.

Introdução

Devido à exploração de recursos naturais e conversão da cobertura da terra para agropecuária, grande parte da Mata Atlântica foi desmatada (Gelain et al. 2012). A Mata Atlântica é uma floresta tropical que se distribui desde a região Nordeste à região Sul do Brasil (Fiasch & Pirani 2009) onde também se concentra a maior parte da população brasileira (INPE; SOS Mata Atlântica, 2015). Atualmente, restam ~31% de cobertura florestal na Mata Atlântica (Projeto MapBiomas 2026). O bioma é classificado como hotspot devido à intensa perda de habitat e ao seu alto grau de endemismo (Myers et al. 2000). No Nordeste, encontra-se o Centro de Endemismo de Pernambuco (CEP), uma sub-região de Mata Atlântica acima do Rio São Francisco, com importância particular do ponto de vista da diversidade e conservação (Tabarelli et al., 2005). Atualmente, a floresta nesta região é escassa, sendo a maioria dos fragmentos menores do que 5.000 ha (Ribeiro et al., 2009), com áreas protegidas relativamente pequenas e isoladas (Silva & Tabarelli, 2001).

A diversidade de espécies vegetais presentes ao longo da Mata Atlântica possibilita diferentes ciclos de produção de folhas, flores e frutos durante o ano, contribuindo para a oferta de alimento aos animais em distintas estações (Morellato et al., 2000). A análise fenológica é importante para compreender a resposta da vegetação às variações climáticas e os padrões de disponibilidade de recursos ao longo do tempo (Morellato, 2003). O estudo fenológico permite identificar processos relacionados à reprodução e à

regeneração das plantas (Reznik et al., 2012), além de avaliar a manutenção de seus ciclos ao longo dos anos e os impactos decorrentes dessas alterações. Em ambientes impactados pelo desmatamento, como o CEP, podem ocorrer alterações nos padrões reprodutivos (Tabarelli et al., 2010), de modo que mudanças no período de frutificação podem resultar em momentos de escassez de alimento para alguns animais dispersores. Os estudos fenológicos das plantas contribuem para a avaliação e compreensão da disponibilidade de recursos para espécies frugívoras e folívoras, como o primata *Alouatta belzebul* (guariba-de-mãos-ruivas).

Alouatta belzebul é um primata Neotropical que tem distribuição disjunta, sendo a maior parte desta na Amazônia, e uma pequena parcela na Mata Atlântica no Nordeste, ao longo do CEP (Gregorin 2006), . Nesta região, a espécie tem ocorrência restrita a poucas localidades, caracteristicamente fragmentos florestais imersos em uma matriz predominantemente de cana-de-açúcar (Fialho et al., 2014).

O primata *Alouatta belzebul* possui hábitos arborícolas e é dependente de ambientes florestais. Atualmente essa espécie é classificada como Vulnerável tanto internacionalmente pela IUCN, como nacionalmente pelo Ministério do Meio Ambiente (Valença-Montenegro et al., 2021, 2024). Os grupos de *A. belzebul* são normalmente pequenos, compostos por cinco a 10 indivíduos (Bonvicino, 1989; Buss et al., 2017), possuindo área de vida entre 4,7 e 9,5 hectares (Bonvicino, 1989). A dieta desse primata é majoritariamente constituída por frutos (principalmente Inga spp. – Fabaceae, e Ficus spp. – Moraceae), com aumento no consumo de folhas em períodos de seca ou pouca abundância de frutos (preferencialmente folhas novas) (Bonvicino, 1989; Ludwig et al., 2020). A vocalização territorial típica dos macacos do gênero Alouatta, muitas vezes utilizada como indicador indireto de competição entre grupos (Holzmann et al., 2012), auxilia na regulação do uso do território (Cunha & Byrne, 2006) e na determinação da área do grupo, sem necessidade de embates físicos. A vocalização também pode ser influenciada pela disponibilidade de recursos (Lastra et al., 2023; Ceccarelli et al., 2021), variando em frequência e intensidade ao longo do ano. Portanto, padrões fenológicos podem estar diretamente relacionados à sua dieta, e, consequentemente, à socialização e disputa territorial.

Metodologia

O objetivo principal deste trabalho é investigar a atividade de vocalização de longo alcance do *Alouatta belzebul* na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Gargaú e na Reserva Biológica (REBIO) Guaribas, em um fragmento de Mata Atlântica da Paraíba. Os resultados deste projeto contribuirão para ampliar o conhecimento sobre a ecologia de *A. belzebul* no Centro de Endemismo de Pernambuco, fornecendo informações importantes para sua conservação. Além disso, poderão apoiar ações do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Primatas do Nordeste, especialmente no manejo e soltura de indivíduos, indicando períodos de maior atividade vocal. Essas informações também poderão auxiliar na identificação da presença da espécie em fragmentos ainda pouco estudados.

O estudo foi realizado em dois fragmentos de Mata Atlântica no estado da Paraíba, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Gargaú (7°00’44”S, 34°57’25”W; 1.059 ha), localizada no município de Santa Rita (Figura 1-1) e a Reserva Biológica (REBIO) Guaribas SEMA 2 (6°43'17"S, 35°10'49"W; 3.016 ha), situada no município de Mamanguape (Figura 1-2). Ambas as áreas representam remanescentes de floresta ombrófila e semidecidual inseridos em uma matriz fortemente antropizada, com predominância de monoculturas de cana-de-açúcar.

Este estudo fenológico está associado a um projeto de pesquisa sobre fenologia e ecologia sonora de A. belzebul, conduzido em dois fragmentos florestais ao longo do Centro de Endemismo de Pernambuco. Foram estabelecidos cinco pontos amostrais, três pontos inseridos na RPPN Gargaú e dois pontos na REBIO Guaribas. Os pontos têm distância de pelo menos 2 km entre si. Cada ponto possui três parcelas associadas, totalizando 15 parcelas para amostragem da fenologia. A RPPN Gargaú possui nove parcelas divididas em três pontos amostrais (P1, P2, e P3), enquanto a REBIO Guaribas possui seis parcelas, distribuídas em dois pontos amostrais (P1 e P2).

As parcelas foram instaladas com auxílio de uma trena de 50 m em linha reta e barbantes de 4 m de comprimento para definir a largura (200 m²). Uma vez estabelecida a parcela, foram marcados todos os indivíduos inseridos na mesma, com auxílio de etiquetas plásticas numeradas (Figura 2). Foram incluídos apenas indivíduos com porte arbóreo com diâmetro de fuste à altura do peito (DAP) ≥ 10 cm. A marcação com etiquetas numeradas permitiu a identificação individual das árvores para acompanhamento ao longo do tempo.

As coletas de dados fenológicos ocorreram mensalmente, preferencialmente realizadas na primeira semana de cada mês. Cada expedição contou com o mínimo de dois observadores por parcela. Durante as coletas, para cada indivíduo, registou-se a presença e a intensidade das seguintes fenofases: folhas imaturas, folhas maduras, flores e frutos. A estimativa da intensidade fenológica foi realizada de forma visual, com o auxílio de binóculos, a fim de facilitar a observação da copa das árvores. Foi adotado o índice de Fournier (1974), que utiliza uma escala ordinal de 0 a 4, com incrementos de 25% entre os níveis, conforme os protocolos padronizados na literatura (ver Agostini et al., 2010). Além das observações visuais direcionadas à copa, também foi realizada a inspeção da serrapilheira ao redor dos indivíduos monitorados, visando detectar a presença de flores, frutos ou folhas recém caídas, as quais auxiliaram na identificação dos indivíduos e das fenofases registradas.

Os indivíduos arbóreos serão identificados até o menor nível taxonômico possível, com uso da bibliografia especializada. A identificação preliminar de alguns indivíduos foi realizada devido a experiência prévia da equipe, além do auxílio de aplicativos como o Plantnet, consulta a livros como Árvores Brasileiras (Lorenzi 2020), consulta a sítios de internet como a Lista de Verificação da Flora Brasileira (Flora e Funga do Brasil 2025) e Plant of the World Online Database – Royal Botanical Gardens (Kew – https://powo.science.kew.org/) (POWO, 2025) e artigos publicados, que realizaram coleta na região de estudo, sobre fenologia (Fortunato & Quirino, 2016; Nobre et al., 2016), levantamento de flora na região do Centro de Endemismo de Pernambuco (Pereira et al., 2017; Barbosa et al., 2011; Amazonas & Barbosa, 2011; Lima et al., 2008; Dionísio et al., 2010 ; Santana et al., 2018;), além de artigos voltados à dieta do A. belzebul (Ludwig et al., 2020).

Após a coleta dos dados fenológicos, foram realizadas análises computacionais geradas no ambiente de programação R (R Core Team, 2026), utilizando o método de estatística direcional do pacote circular (Agostinelli & Lund, 2022). O mapa da área de estudo foi elaborado no software livre de Sistema de Informação Geográfica QGIS (QGIS.ORG, 2026).

Resultados e Discussões

Em fevereiro de 2026 foi iniciado o monitoramento fenológico, tendo sido acompanhados 155 indivíduos arbóreos na RPPN Gargaú (P1 = 53; P2 = 62; P3 = 40), enquanto para a REBIO Guaribas, foram 137 indivíduos (P1 = 78; P2 = 59). A partir dos dados coletados e da análise circular das fenofases das plantas que fazem parte da dieta de *Alouatta belzebul* (ver Ludwig et al., 2020), encontramos que, como esperado para um bioma de floresta perene, a presença de folhas maduras manteve-se constante ao longo do ano (figura 3 e 4, verde escuro), refletindo a manutenção do dossel foliar típico da Mata Atlântica. Durante o período de monitoramento, observou-se que a emissão de folhas novas apresentou um pico no mês de novembro na RPPN Gargaú (figura 3 verde claro), enquanto a REBIO Guaribas apresentou pico de folhas novas em dezembro (figura 4 verde claro) com uma redução progressiva nos meses seguintes. Em relação às fenofases reprodutivas, a floração atingiu seu ápice, nas duas áreas de estudo, nos primeiros meses do ano, em janeiro e fevereiro (figura 3 e 4 amarelo), seguida por uma queda acentuada na incidência de flores nas parcelas monitoradas. A frutificação, embora tenha sido a fenofase menos frequente entre todas, apresentou nas duas áreas um pico entre os meses de março e maio (figura 3 e 4 vermelho), em consonância com o período subsequente ao auge da floração, o que sugere um padrão reprodutivo sazonal para as espécies estudadas.

Igualmente a partir dos dados coletados, criamos uma prancha de plantas, para uso ao longo do projeto, contendo imagens das espécies mais abundantes na região do CEP, com foco nas plantas arbóreas na região da Paraíba. A prancha de plantas tem nos auxiliado a identificar as espécies de algumas plantas, seja pelo caule, folhas, ou determinadas estruturas visualizadas, como botão floral, flor, fruto imaturo ou maduro. Já identificamos indivíduos das espécies *Apeiba tibourbou* (Aubl.), *Bowdichia virgilioides* (Kunth.), *Byrsonima sericea* (DC.), *Didymopanax morototoni* (Aubl.), *Eschweilera ovata* (Cambess.), *Guazuma ulmifolia* (Lam.), *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.), *Inga thibaudiana* (DC.), *Lecythis pisonis* (Cambess.), *Manilkara salzmannii* (A.DC.), *Ocotea glomerata* (Nees) Mez, *Pouteria grandiflora* (A.DC.) Baehni, *Protium heptaphyllum* (Aubl.), *Tapirira guianensis* (Aubl.), *Thyrsodium spruceanum* (Benth.) e *Xylopia frutescens* (Aubl.).

Durante os meses de expedições a campo, foi possível observar a ocorrência da floração em algumas espécies, como *Didymopanax morototoni* (Aubl.), *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.), entre outras, além de outros indivíduos cuja identificação específica ainda não foi plenamente confirmada. Também foi possível acompanhar a frutificação de espécies como *Tapirira guianensis* (Aubl.), *Byrsonima sericea* (DC.) entre outros indivíduos. De forma empírica, vimos indivíduos florescer antes de começarmos o estudo fenológico, como *Bowdichia virgilioides* (Kunth.) e *Himatanthus*

phagedaenicus (Mart.) e a frutificação de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) E *Didymopanax morototoni* (Aubl.).

Conclusão

O monitoramento fenológico realizado ao longo do período de estudo permitiu identificar padrões claros e diferenciados entre as fenofases vegetativas e reprodutivas das espécies arbóreas analisadas. A emissão de folhas novas apresentou sazonalidade, enquanto as folhas maduras mantiveram-se presentes de forma constante, refletindo a perenidade típica da vegetação da Mata Atlântica. As fenofases reprodutivas, como floração e frutificação, também revelaram padrões sazonais, com picos bem definidos e sequenciais.

Esses resultados contribuem para o entendimento das estratégias ecológicas adotadas pelos primatas em ambientes fragmentados, fornecendo subsídios para ações de conservação e manejo no Centro de Endemismo de Pernambuco. O monitoramento fenológico é fundamental para detectar possíveis mudanças associadas à disponibilidade de recursos, além de aprofundar o conhecimento sobre a dinâmica temporal das espécies arbóreas da região.

Referências

Agostinelli C & Lund U. 2025. R package 'circular': Circular Statistics (version 0.5-2). URL https://CRAN.R-project.org/package=circular

Agostini I, Holzmann I, Di Bitetti MS 2010. Are howler monkey species ecologically equivalent? Trophic niche overlap in syntopic Alouatta guariba clamitans and Alouatta caraya. American Journal of Primatology 72:173-186. https://doi.org/10.1002/ajp.20775

Amazonas NT & Barbosa MRV. Levantamento florístico das angiospermas em um remanescente de floresta Atlântica estacional na microbacia do rio Timbó, João Pessoa, Paraíba. Revista Nordestina de Biologia 20(2):67-78.

Barbosa MRV, Thomas WW, Zárate ELP et al. 2011. Checklist of the vascular plants of the Guaribas Biological Reserve, Paraíba, Brazil. Revista Nordestina de Biologia, João Pessoa 20(2):79-106. 2011.

Bonvicino CR. 1989. Ecologia e comportamento de Alouatta belzebul (Primates: CEBIDAE) na Mata Atlântica. Revista Nordestina de Biologia 6(2):149-179.

Buss G, de Souza Fialho M, Jerusalinsky L,et al. 2017. Abundância e densidade de primatas na Reserva Biológica do Gurupi, Maranhão, Brasil/Abundance and primate density in Gurupi Biological Reserve, Maranhão, Brazil. Biodiversidade Brasileira 7(2):47-57.

Ceccarelli E, Rangel-Negrín A, Coyohua-Fuentes A, et al. 2021. Vocal and movement responses of mantled howler monkeys (Alouatta palliata) to natural loud calls from neighbors. American Journal of Primatology 83(5):e23252. https://doi.org/10.1002/ajp.23252

Cunha RTG, & Byrne RW. 2006. Roars of black howler monkeys: evidence for a function in intergroup spacing. Behaviour143:1169-1199.

Dionísio GO, Barbosa MRV, Lima HC. 2010. Leguminosas arbóreas em remanescentes florestais localizados no extremo norte da Mata Atlântica. Revista Nordestina de Biologia 19(2):15-24.

Fialho MS, Valença-Montenegro MM, Silva TCF, et al. 2014. Ocorrência de Sapajus flavius e Alouatta belzebul no centro de endemismo Pernambuco. Neotropical Primates 21(2):214-218. https://doi.org/10.1896/044.021.0215

Fiaschi P & Pirani JR. 2009. Revisão de estudos biogeográficos de plantas no Brasil. Journal of Systematics and Evolution 47:477-496. https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2009.00046.x

Flora e Funga do Brasil (2025) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. http://floradobrasil.jbrj.gov.br/

Fortunato MEM & Quirino ZGM. 2016. Efeitos da fragmentação na fenologia reprodutiva de espécies arbóreas presentes em borda e interior de Mata Atlântica Paraibana. Rodriguésia 67(3):603-614. https://doi.org/10.1590/2175-7860201667305

Gelain AJL, Lorenzett DB, Neuhaus M, et al. 2012. Desmatamento no Brasil: um problema ambiental. Revista Capital Científico – Eletrônica (RCCe) 10(2): 55–76. https://revistas.unicentro.br/index.php/capitalcientifico/article/view/1110

Gregorin R. 2006. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero Alouatta Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 23(1): 64–144.

Holzmann, I, Agostini I, Di Bitetti M. 2012. Roaring behavior of two syntopic howler species (Alouatta caraya and A. guariba clamitans): evidence supports the mate defense hypothesis. International Journal of Primatology 33(2) 338–55. https://doi.org/10.1007/s10764-012-9583-6.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). 2018. Áreas importantes para conservação dos primatas ameaçados do Nordeste. https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-primatas-do-nordeste/2-ciclo/pan-primatas-do-nordeste-sumario.pdf (acesso em 20/07/2025)

INPE, SOS Mata Atlântica. 2015. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2013-2014. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.

Lastra, NM, Negrín AR, Dias PAD. 2023. Behavioral responses of mantled howler

monkeys to neighbor long-distance vocalizations. American Journal of Biological Anthropology 182(1):59–68. https://doi.org/10.1002/ajpa.24810.

Lima ALA, Rodal MJN, Lins-e-Silva ACB. 2008. Phenology of tree species in a fragment of Atlantic Forest in Pernambuco – Brazil. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability 2(1): 68–75.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2020.

Ludwig G, Lima GYF, Azevedo RB, et al. 2020. Howlers in an anthropogenic matrix: how does an Alouatta belzebul group deal with the severely fragmented landscape of the Atlantic forest in northeastern Brazil?. Neotropical Primates 26(2): 7-16. https://doi.org/10.62015/np.2020.v26.49

Morellato LPC. 2003. South America. In: M.D. Scwartz (ed.). Phenology: an integrative environmental science. Springer, Netherlands 75-92.

Morellato LPC, Talora DC, Takahasi A, et al. 2000, Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. Biotropica 32:811-823. https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00620.x

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403(6772):853–58. https://doi.org/10.1038/35002501.

Nobre GDS, Silva Neto E, Quirino, ZGM. 2023. Fenologia da vegetação arbórea em remanescente de Mata Atlântica no estado da Paraíba. CLCS 16:24854–24872. https://doi.org/10.55905/revconv.16n.11-008

Pereira LA, Chagas ECO, Barbosa MRV. 2017. Composição florística de um fragmento de mata ciliar na bacia hidrográfica do Rio Cabelo, João Pessoa, Paraíba, Brasil. Revista Nordestina de Biologia, 25(1): 45-60.

Pinto SR, Melo F, Tabarelli M, et al. 2014. Governing and delivering a biome-wide restoration initiative: the case of Atlantic Forest Restoration Pact in Brazil. Forests 5:2212-2229. https://doi.org/10.3390/f5092212

Posit team (2026). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC,Boston, MA. URL http://www.posit.co/.

POWO (2025). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; https://powo.science.kew.org/

Projeto MapBiomas. 2026. Coleção 11 da Série Anual de Mapas de Uso e Cobertura da Terra do Brasil, acessado em 26 agosto de 2026 através do link: https://plataforma.brasil.mapbiomas.org/

QGIS.ORG. QGIS Geographic Information System. QGIS Association, 2026. Disponível em:https://www.qgis.org. Acesso em: 26 ago. 2026.

Reznik G, Pires JPDA, Freitas L. 2012. Efeito de bordas lineares na fenologia de espécies arbóreas zoocóricas em um remanescente de Mata Atlântica. Acta Botanica Brasilica 26: 65-73.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, et al. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation 142(6) 1141–53. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021.

Santana JP, Rocha PA, Oliveira EV, et al. 2018. Padrões fenológicos de espécies zoocóricas arbustivo-arbóreas em duas áreas na Floresta Nacional do Ibura, Brasil. Neotropical Biology and Conservation 13(3):212-223. DOI: 10.4013/nbc.2018.133.04

Silva JMC & Tabarelli M. (2001). The future of the Atlantic Forest in Northeastern Brazil. Conservation Biology 15:819-820. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.00014-4.x

Tabarelli M, Pinto L P, Silva JMC, et al. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade 1(1)132-138.

Tabarelli M, Aguiar AV, Ribeiro MC, et al. 2010. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. Biological Conservation, [S. l.], 143(10):2328-2340. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.02.005.

Valença-Montenegro MM, Fialho MS, Carvalho AS,et al. 2021. Alouatta belzebul (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T39957A190412426. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T39957A190412426.

Valença-Montenegro MM, Souza FV, Mourthé Í, et al.. 2024. Alouatta belzebul (Linnaeus, 1766). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. Disponível em: https://salve.icmbio.gov.br

Anexos



Figura 1. Fragmentos da Mata Atlântica no Centro de Endemismo de Pernambuco onde o estudo foi realizado. 1- Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Gargaú, Santa Rita, Paraíba; 2- Reserva Biológica (REBIO) Guaribas, Mamanguape, Paraíba.



Figura 2. Esquema da distância entre ponto amostral (dados acústicos) e parcela amostral (dados fenológicos), bem como dimensão de uma parcela amostral para o estudo fenológico; Etiqueta usada para identificação de indivíduo arbóreo pertencente a parcela



Figura 3. Gráficos circulares referentes à intensidade das fenofases dos indivíduos arbóreos ao longo dos meses na RPPN Gargaú. Intensidade de folhas maduras em verde escuro, de folhas imaturas em verde claro, de flores em amarelo e de frutos em vermelho.



Figura 4. Gráficos circulares de intensidade das fenofases dos indivíduos arbóreos ao longo dos meses na REBIO Guaribas. Intensidade de folhas maduras em verde escuro, de folhas imaturas em verde claro, de flores em amarelo e de frutos em vermelho

CÓDIGO: SB0850

AUTOR: ANNE HELOYSE GALVAO DE ARAUJO

ORIENTADOR: RAFAEL WESLEY BASTOS

TÍTULO: METABÓLITOS SECRETADOS PELA BACTÉRIA Pseudomonas aeruginosa INIBEM O CRESCIMENTO DO FUNGO Candida auris E REVERTEM A RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL

Resumo

A resistência de *Candida auris* (*C. auris*) a múltiplas classes de antifúngicos, especialmente aos azóis, como o fluconazol, representa crescente ameaça à saúde pública. Nesse contexto, estratégias que potencializam a atividade de antifúngicos disponíveis são relevantes. O presente estudo avaliou o efeito de metabólitos secretados por *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) sobre o crescimento e a suscetibilidade de *C. auris* ao fluconazol. Os metabólitos foram obtidos em diferentes tempos de cultivo, liofilizados e reconstituídos na forma de meio condicionado (MC) (5× concentrado), utilizado na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a diferentes isolados de *C. auris*. Adicionalmente, avaliou-se a associação entre o MC e o fluconazol em isolados com perfis distintos de suscetibilidade. Os metabólitos apresentaram efeito inibitório consistente sobre *C. auris* em todos os tempos avaliados, sendo estabelecido o período de 24 horas como padrão para as etapas seguintes. O MC apresentou CIM de 12,5 µg/mL para os cinco isolados testados, independentemente do perfil de resistência ao fluconazol. Na associação com o antifúngico, observou-se redução expressiva da CIM do fluconazol (de 256,0 µg/mL para 4,5 µg/mL) frente ao isolado resistente, correspondendo a uma redução de 64 vezes. Os resultados indicam que o MC de PA14 possui atividade inibitória contra *C. auris* e é capaz de sensibilizar isolados resistentes ao fluconazol, sugerindo seu potencial como adjuvante antifúngico.

Palavras-chave: Interação microbiana.Metabólitos.Sinergismo.Resistência aos azóis.

TITLE: Metabolites secreted by the bacterium Pseudomonas aeruginosa inhibit the growth of the fungus Candida auris and reverse fluconazole resistance.

Abstract

The resistance of *Candida auris* (*C. auris*) to multiple classes of antifungal drugs—particularly azoles such as fluconazole—poses a growing public health threat. In this context, strategies that enhance the activity of available antifungals are significant. This

study evaluated the effect of metabolites secreted by *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) on the growth and fluconazole susceptibility of *C. auris*. Metabolites were harvested at various cultivation time points, lyophilized, and reconstituted as conditioned medium (CM) (5× concentrated); this CM was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against different *C. auris* isolates. Additionally, the combination of CM and fluconazole was evaluated using isolates with distinct susceptibility profiles. The metabolites demonstrated a consistent inhibitory effect on *C. auris* across all time points evaluated, with the 24-hour period established as the standard for subsequent stages. The CM exhibited an MIC of 12.5 µg/mL against all five tested isolates, regardless of their fluconazole resistance profile. When combined with the antifungal, a significant reduction in the fluconazole MIC was observed for the resistant isolate (from 256.0 µg/mL to 4.5 µg/mL), representing a 64-fold decrease. These results indicate that PA14 CM possesses inhibitory activity against *C. auris* and can sensitize fluconazole-resistant isolates, suggesting its potential as an antifungal adjuvant.

Keywords: Microbial interaction. Metabolites. Synergism. Azole resistance.

Introdução

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), incluindo aquelas associadas à assistência hospitalar e domiciliar, têm recebido crescente atenção devido ao impacto na saúde pública. As unidades de terapia intensiva (UTI) apresentam particular vulnerabilidade pela presença de pacientes graves e frequentemente imunocomprometidos. A disseminação de microrganismos nesses ambientes pode estar relacionada a falhas na higienização das mãos, manejo inadequado por profissionais de saúde e limpeza insuficiente (Dias; Woellner, 2024).

Esse cenário é agravado pela disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, entre os quais se destaca o fungo emergente *Candida auris*. O primeiro relato de isolamento de *C. auris* ocorreu no canal auditivo de uma paciente no Japão, em 2009 (Staoh et al., 2009). Desde então, esse patógeno tem recebido atenção crescente devido à sua capacidade de persistir em ambientes hospitalares, disseminar-se entre pacientes, resistir a múltiplos antifúngicos e causar infecções invasivas graves (Bing et al., 2024).

Entre os antifúngicos utilizados no tratamento de infecções por *Candida*, destacam-se os azóis, como o fluconazol; os polienos, como a anfotericina B; e as equinocandinas. Os azóis atuam sobre a biossíntese do ergosterol, componente essencial da membrana celular fúngica, por meio da inibição da enzima lanosterol 14α-desmetilase, codificada pelo gene ERG11. Essa inibição interrompe a via de biossíntese do ergosterol e favorece o acúmulo de esteróis intermediários anormais, que são incorporados à membrana, comprometendo sua estrutura e função, resultando em efeito fungistático (Bastos et al., 2020). A anfotericina B, por sua vez, interage com o ergosterol e forma poros na membrana, com consequente extravasamento de componentes intracelulares e morte celular. Já as equinocandinas inibem a síntese de β-1,3-D-glucano, comprometendo a integridade da parede celular e promovendo efeito fungicida contra a maioria das espécies de *Candida* (Bastos et al., 2020).

Apesar dessas opções, o tratamento de infecções por *C. auris* é limitado pelas altas taxas de resistência. A resistência ao fluconazol pode chegar a 97% em determinados grupos (Arendrup et al., 2023). A resistência à anfotericina B é, em geral, de 24%, podendo alcançar quase 50%, enquanto a resistência às equinocandinas é inferior a 5%, razão pela qual são recomendadas como primeira linha de tratamento (Silva et al., 2025).

Além de *C. auris*, *Pseudomonas aeruginosa* apresenta importância no contexto das IRAS. Essa bactéria é frequentemente isolada de amostras clínicas e ambientais, apresenta elevada capacidade de adaptação (Vadakkan et al., 2024), mecanismos de resistência a diferentes antibióticos e capacidade de produzir metabólitos com atividade antimicrobiana, além de influenciar a formação de biofilmes de outros microrganismos (Krell; Matilla, 2024).

A presença simultânea de diferentes microrganismos pode resultar em interações capazes de modificar o comportamento e a sobrevivência das espécies, por competição por nutrientes e espaço ou pela produção de moléculas com atividade antimicrobiana (Peleg et al., 2010). Nesse contexto, estudos do grupo de pesquisa do Dr. Rafael Bastos demonstraram que *P. aeruginosa* inibe o crescimento de *C. auris* em co-cultivo em meio líquido RPMI, utilizando proporção de 10:1 (bactéria:levedura), incubação a 37 °C por 24 horas e quantificação por UFC/mL. Adicionalmente, o sobrenadante livre de células de *P. aeruginosa*, concentrado por liofilização, também inibiu o crescimento fúngico, sugerindo que metabólitos secretados pela bactéria são responsáveis pelo efeito antagonista (Macedo et al., 2025). Esses achados indicam potencial nos compostos produzidos por *P. aeruginosa* para interferir na sobrevivência de *C. auris*. Diante disso, este estudo buscou aprofundar a investigação sobre o efeito desses metabólitos sobre *C. auris*.

Metodologia

Microrganismos

Foram utilizados cinco isolados de *Candida auris*: 467/15, proveniente de surto na Venezuela (Calvo et al., 2016); 136/18, da África do Sul (Magobo et al., 2014); 138/18, da Coreia do Sul (Lee et al., 2011); URM 8616, de surto no Brasil e pertencente à coleção University Recife Mycologia (URM), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); e CBS 10913, do Japão (Satoh et al., 2009). Também foi utilizada a cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa* (Macedo et al., 2025). Os microrganismos pertencem à coleção de culturas do Grupo de Pesquisa em Interações Microbianas (GPIM) e foram armazenados a −80 °C em meio suplementado com 20% de glicerol até a realização dos experimentos.

Obtenção do Sobrenadante Livre de Células (SLC) de Pa14

Inicialmente, *P. aeruginosa* foi cultivada em meio BHI a 37°C por 24 horas. Um inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril até turbidez equivalente à

escala 9 de McFarland (3,0 × 10^9 UFC/mL). Em seguida, as bactérias foram inoculadas em tubos Falcon de 50 mL contendo 10 mL de RPMI-1640 1X (Gibco, EUA), tamponado com MOPS a 0,165 M, para obtenção de 1,0 × 10^6 UFC/mL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 8, 16, 24 e 48 horas, em triplicata. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante filtrado em filtro de menbrana 0,22 µm, enquanto o pellet foi descartado. A esterilidade do SLC foi verificada por semeadura em Cetrimide e incubação a 35 °C por 24 horas. A ausência de crescimento confirmou a eficácia da filtração (Macedo et al., 2025).

Obtenção do Meio Condicionado

Para concentrar os metabólitos presentes no SLC de *P. aeruginosa* PA14, as amostras foram submetidas à liofilização. Inicialmente, o SLC foi congelado a −80 °C por 4 horas e, em seguida, transferido para o liofilizador, onde permaneceu por 48 horas até a obtenção do material liofilizado. Após a liofilização, o SLC obtido nos diferentes tempos de cultivo de P. aeruginosa PA14 foi reconstituído em meio RPMI-1640-MOPS utilizando um volume correspondente a 1/5 do volume original da amostra, resultando em uma preparação cinco vezes concentrada (5×) em relação ao SLC original. Essa preparação, contendo os metabólitos extracelulares produzidos por P. aeruginosa PA14 e concentrados por liofilização, foi denominada meio condicionado (MC) e utilizada nos experimentos subsequentes.

Efeito do meio condicionado de P. aeruginosa obtido em diferentes tempos de cultivo sobre o crescimento de C. auris

Os MC obtidos nos diferentes tempos de cultivo de *P. aeruginosa* PA14 foram utilizados para avaliar o efeito dos metabólitos sobre o crescimento de *C. auris* 467/15. Em placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de MC e 100 µL de suspensão de *C. auris* contendo 1 × 10^4 UFC/mL por poço. Como controle, a levedura foi inoculada em RPMI-1640 sem MC. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em ágar Sabouraud dextrose. O crescimento de *C. auris* na presença dos MCs obtidos nos diferentes tempos de cultivo de *P. aeruginosa* PA14 foi comparado ao crescimento da levedura no controle contendo apenas RPMI-1640 (Reis et al., 2023).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM do MC foi determinada por microdiluição em caldo, seguindo os princípios do documento M27 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Foram avaliados os isolados CBS 10913, 467/15, 136/18, 138/18 e URM 8616 de *C. auris*. O MC foi testado em concentrações de 100 a 0,19 µg/mL, obtidas por diluições seriadas, em placas de 96 poços contendo o MC e o inóculo fúngico. Poços contendo apenas o inóculo foram utilizados como controle de crescimento. Após incubação a 37 °C por 24 horas, o crescimento foi avaliado por densidade óptica a 600 nm (DO_{600}). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de promover 100% de inibição do crescimento em relação ao controle.

Ensaio de associação entre MC e o fluconazol

A associação entre o MC e o fluconazol foi realizado pelo método de microdiluição em *checkerboard* (Dos Reis et al. 2023) , utilizando placas de 96 poços. Foram avaliados dois isolados de C. auris com diferentes perfis de suscetibilidade ao fluconazol: o isolado sensível, CBS 10913, e o isolado resistente, 467/15. Foram avaliadas diferentes combinações entre o MC e o fluconazol, permitindo analisar a alteração da atividade do antifúngico na presença dos metabólitos. Para cada combinação, foram adicionados 50 µL das diferentes concentrações do MC e 50 µL das diferentes concentrações de fluconazol. Para o isolado resistente, foram avaliadas concentrações de fluconazol entre 256,0 e 0,25 µg/mL, enquanto para o isolado sensível foram avaliadas concentrações entre 64,0 e 0,06 µg/mL. As concentrações do MC avaliadas variaram de 12,5 a 0,2 µg/mL. A viabilidade celular e os resultados da associação foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico de XTT (2,3-Bis-(2-Metóxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazólio-5-Carboxanilida), conforme Bastos et al. (2019)

A interação também foi avaliada quantitativamente pela determinação do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF): ICIF= [CIM do MC em combinação /CIM isolado do MC] + [CIM do antifúngico em combinação/CIM isolado do antifúngico]. O ICIF foi calculado para todas as combinações possíveis de diferentes concentrações para o mesmo isolado e o resultado final será expresso como a média dos ICIFs (Brennan-Krohn et al., 2021).

Análises estatísticas e construção de gráficos

Os dados foram analisados no GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Para comparação entre duas condições, foi utilizado o teste t de Student não pareado, considerando significância de 95% ($p < 0,05$). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e os resultados expressos como média ± desvio padrão. Os gráficos de barras e mapas de calor (heat maps) foram construídos no GraphPad Prism

Resultados e Discussões

Efeito dos diferentes tempos de cultivo sobre o crescimento de C. auris

A avaliação do efeito dos metabólitos secretados obtidos nos diferentes tempos de cultivo de Pa14 demonstrou uma redução significativa de, em média, 1000 vezes (3 ciclos log) do crescimento de *C. auris* em todos os períodos avaliados. O efeito inibitório é observado no primeiro tempo analisado, correspondente a 8 horas de cultivo, e permanece semelhante nos demais períodos, incluindo 16, 24 e 48 horas, não havendo diferença significativa da redução entre os tempos de cultivo (Figura 1).

A ausência de diferença estatística entre os períodos avaliados do MC de P. aeruginosa indica que o aumento do tempo de cultivo não resultou em aumento do efeito inibitório sobre C. auris. Dessa forma, o período de 24 horas foi estabelecido como tempo padrão para a obtenção dos metabólitos secretados nas etapas posteriores do estudo.

Determinação da CIM do MC

Uma vez observado que o MC de *P. aeruginosa* reduz o crescimento de *C. auris* (Figura 1), determinou-se qual a menor concentração capaz de inibir 100% das células fúngicas por meio de teste de microdiluição em caldo.

A CIM do MC de *P. aeruginosa* foi de 12,5 µg/mL para os quatro isolados de *C. auris* avaliados (467/15; 136/18, 138/18 e CBS 10913), tanto para aqueles que são sensíveis ao fluconazol (136/18, 138/18 e CBS 10913) quanto para os resistentes (467/18) (tabela 1).

Esse resultado demonstra que, nas condições avaliadas, a atividade inibitória do MC de *P. aeruginosa* ocorreu na mesma concentração para os diferentes perfis de suscetibilidade ao fluconazol, indicando que a resistência prévia ao antifúngico não resultou em alteração da CIM do MC de *P. aeruginosa* .

Ensaio de associação entre o Meio Condicionado e o fluconazol

A associação entre o MC e o fluconazol foi avaliada pelo ensaio de XTT, com o objetivo de determinar o efeito das diferentes combinações sobre a viabilidade celular de *C. auris.* Para o isolado CBS 10913, não foram observadas alterações na atividade do fluconazol quando associado ao MC. A CIM do MC isoladamente foi de 12,5 µg/mL e permaneceu em 12,5 µg/mL quando em combinação com o fluconazol (Figura 2). Da mesma forma, a CIM do fluconazol foi de 1 µg/mL tanto isoladamente quanto em combinação com o MC. O ICIF obtido foi de 2,0, caracterizando a interação entre os dois agentes como indiferente (ICIF > 0,5 e ≤ 4,0).

Em contrapartida, para o isolado 467/15, resistente ao fluconazol, observou-se aumento expressivo da atividade do antifúngico quando associado ao MC. Na presença de 12,5 µg/mL de MC, 100% de inibição do crescimento foi alcançada com 4,0 µg/mL de fluconazol. Em comparação, quando utilizado isoladamente, o fluconazol promoveu 100% de inibição apenas na concentração de 256 ,0 µg/mL. Dessa forma, a presença do MC reduziu em 64 vezes a concentração de fluconazol necessária para promover a inibição completa do crescimento de C. auris 467/15 (Figura 3).

Apesar do expressivo aumento da atividade do fluconazol na presença do MC, não foi possível calcular o ICIF para essa associação, uma vez que a CIM do MC isoladamente não foi determinada dentro da faixa de concentrações avaliada. Assim, a interação entre os dois agentes não pôde ser classificada pelo ICIF.

DISCUSSÃO

C. auris e P.aeruginosa são patógenos de relevância crítica no contexto IRAS, compartilhando características como capacidade de persistência em ambientes hospitalares, resistência a múltiplos agentes antimicrobianos e associação a surtos em unidades de terapia intensiva (Du H et al., 2020; Grainha et al., 2020). A coexistência desses microrganismos em nichos ecológicos comuns, como a pele de pacientes hospitalizados e superfícies hospitalares, sugere que interações interespecíficas podem ocorrer e influenciar a dinâmica de colonização e infecção (Almeida Júnior et al., 2021). Diante desse cenário, o presente estudo investigou o efeito dos metabólitos secretados

por P. aeruginosa sobre o crescimento e a suscetibilidade de C. auris ao fluconazol, buscando identificar potenciais estratégias para modular a resistência antifúngica.

Os resultados obtidos demonstraram que os metabólitos presentes no meio condicionado de P. aeruginosa, obtidos em diferentes tempos de cultivo (8, 16, 24 e 48 horas), foram capazes de reduzir significativamente o crescimento de C. auris 467/15 em todos os períodos avaliados, com uma redução média de 1000 vezes (3 ciclos log). A ausência de diferenças estatísticas entre os tempos avaliados indica que a produção dos compostos com atividade antifúngica ocorre precocemente (a partir de 8 horas) e se mantém estável ao longo do tempo, sugerindo que esses metabólitos são constitutivamente produzidos ou que sua secreção é regulada por mecanismos independentes do tempo de cultivo nas condições testadas. Esse achado corrobora os dados de Macedo et al. (2025), que observaram inibição persistente de C. auris por P. aeruginosa em co-cultivo, iniciando-se entre 8-12h e se mantendo até 72 horas, reforçando a hipótese de que a bactéria produz moléculas com atividade fungistática estável.

A determinação da CIM do MC de P. aeruginosa revelou que 12,5 µg/mL é capaz de de inibir completamente o crescimento de todos os cinco isolados de C. auris testados, independentemente do perfil de suscetibilidade ao fluconazol. Esse dado é particularmente relevante, pois indica que a atividade inibitória do MC de P. aeruginosa não é afetada pela resistência prévia da levedura aos azóis, sugerindo que os mecanismos de ação dos metabólitos de P. aeruginosa podem ser distintos daqueles envolvidos na resistência ao fluconazol. A manutenção da atividade inibitória do MC de P. aeruginosa frente a isolados resistentes ao fluconazol sugere que esses compostos podem atuar em vias não relacionadas à biossíntese do ergosterol, alvo primário dos azóis, o que representa uma vantagem significativa no contexto da resistência antifúngica.

O ensaio de associação entre o MC de P. aeruginosa e o fluconazol revelou resultados distintos entre os dois perfis de suscetibilidade avaliados. Para o isolado sensível CBS 10913, a combinação resultou em ICIF de 2,0, caracterizando uma interação indiferente (Brennan-Krohn et al., 2021). A ausência de efeito da associação pode estar relacionada à elevada suscetibilidade basal desse isolado ao fluconazol, cuja CIM foi de 1,0 µg/mL.

Em contrapartida, para o isolado resistente 467/15, a associação com o MC aumentou expressivamente a atividade do fluconazol. Na presença de 12,5 µg/mL de MC, 100% de inibição do crescimento foi obtida com 4,0 µg/mL de fluconazol, enquanto o antifúngico isoladamente atingiu o mesmo nível de inibição apenas na concentração de 256,0 µg/mL. Assim, a presença do MC reduziu em 64 vezes a concentração de fluconazol necessária para promover a inibição completa do crescimento. Embora não tenha sido possível calcular o ICIF, uma vez que a CIM do MC isoladamente não foi determinada na faixa de concentrações avaliada, os resultados demonstram uma expressiva potencialização da atividade do fluconazol contra o isolado resistente 467/15.

Esse achado evidencia o potencial dos metabólitos secretados por P. aeruginosa em reverter fenotípicamente a resistência ao fluconazol, tornando um isolado previamente resistente novamente suscetível à ação do antifúngico. Esses resultados abrem novas perspectivas para a identificação e caracterização dos metabólitos bacterianos

responsáveis por esse efeito, bem como para a investigação de seus mecanismos de ação e de seu potencial como moléculas adjuvantes capazes de restaurar a atividade de antifúngicos frente a isolados resistentes de C. auris.

Embora os resultados demonstrem que o MC potencializou expressivamente a atividade do fluconazol contra o isolado resistente, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda precisam ser elucidados. Uma das hipóteses que pode contribuir para explicar esse efeito envolve a capacidade de P. aeruginosa de interferir na homeostase de ferro de outros microrganismos. A bactéria produz sideróforos e outros metabólitos capazes de sequestrar ferro do ambiente, reduzindo sua disponibilidade para células fúngicas (Jos Kramer et al., 2020; Fourie e Pohl, 2019). O ferro é um micronutriente essencial para a fisiologia fúngica, atuando como cofator em diversos processos celulares, incluindo a fosforilação oxidativa e o transporte de elétrons na cadeia respiratória (Caza e Kronstad, 2013). Dessa forma, a limitação de ferro promovida por metabólitos presentes no MC pode desencadear respostas de estresse e alterações metabólicas e transcricionais em C. auris, potencialmente afetando vias envolvidas na resposta aos antifúngicos e contribuindo para o aumento da suscetibilidade ao fluconazol observado neste estudo (Bastos et al., 2020).

Diante desses achados, os próximos passos deverão se concentrar na identificação e caracterização dos metabólitos de P. aeruginosa responsáveis pela atividade antifúngica observada. Para isso, análises por espectrometria de massas poderão ser empregadas para caracterizar o perfil químico do MC e identificar moléculas candidatas, que posteriormente deverão ser avaliadas individualmente quanto à sua atividade contra C. auris e à capacidade de modular a suscetibilidade ao fluconazol. Além disso, será importante investigar se o efeito observado se estende a outras classes de antifúngicos utilizados no tratamento de infecções por Candida, particularmente as equinocandinas e a anfotericina B.

Conclusão

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que os metabólitos secretados por P. aeruginosa apresentam atividade antifúngica contra C. auris, sendo esse efeito pouco influenciado pelo tempo de cultivo bacteriano, uma vez que, a partir de 8 horas de cultivo, já é possível observar atividade inibitória. Além disso, determina a concentração mínima dos metabólitos necessária para promover 100% de inibição do crescimento de diferentes isolados de C. auris, incluindo isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol. A associação desses metabólitos com o fluconazol também potencializa expressivamente a atividade do antifúngico contra o isolado resistente 467/15, reduzindo em 64 vezes a concentração necessária para promover 100% de inibição do crescimento. Em conjunto, esses achados evidenciam o potencial dos metabólitos secretados por P. aeruginosa como fonte de moléculas com atividade antifúngica e capazes de restaurar a suscetibilidade ao fluconazol em C. auris resistente, abrindo perspectivas para a identificação de novos compostos com potencial aplicação como adjuvantes no enfrentamento da resistência antifúngica.

Referências

ARENDURP, M. C. et al. 2023.

BASTOS, R. W. et al. 2019.

BASTOS, R. W. et al. 2020.

BING, J. et al. Candida auris-associated hospitalizations and outbreaks, China, 2018–2023. Emerging Microbes & Infections, v. 13, n. 1, p. 2302843, 2024.

BRENNAN-KROHN, T. et al. 2021.

CALVO, B. et al. First report of Candida auris in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. Journal of Infection, v. 73, n. 4, p. 369–374, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI standard M27. Wayne, PA: CLSI, 2017.

KRELL, T.; MATILLA, M. A. Microbe of the month: Pseudomonas aeruginosa. Trends in Microbiology, v. 32, p. 216–218, 2024.

LEE, W. G. et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by Candida auris. Journal of Clinical Microbiology, v. 49, n. 9, p. 3139–3142, 2011.

MACEDO, A. B. N. et al. Antagonistic effect of Pseudomonas aeruginosa on Candida auris. Frontiers in Fungal Biology, v. 6, p. 1613244, 2025.

MAGOGOBO, R. E. et al. Candida auris-associated candidemia, South Africa. Emerging Infectious Diseases, v. 20, n. 7, p. 1250–1252, 2014.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nature Reviews Microbiology, v. 8, p. 340–349, 2010.

SATOH, K. et al. Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. Microbiology and Immunology, v. 53, p. 41–44, 2009.

VADAKKAN, K. et al. A review of chemical signaling pathways in the quorum sensing circuit of Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Biological Macromolecules, v. 254, pt. 2, p. 127861, 2024.

Anexos



Figura 1- A inibição do crescimento de C. auris na presença do MC de P. aeruginosa foi consistente ao longo do tempo. Em todos os períodos avaliados, observou-se redução significativa de 100 vezes (3 ciclos logs) em média no crescimento de C. auris (Cau)



Tabela 1 – Tabela representando o efeito de inibição no crescimento de diferentes linhagens de Candida auris frente ao meio condicionado de Pseudomonas aeruginosa (Pa14) em concentrações decrescentes.



Figura 2 - Avaliação da interação entre fluconazol e o meio condicionado de P. aeruginosa sobre C. auris CBS 10913. As CIMs isoladas foram de 1 µg/mL para fluconazol e 12,5 µg/mL para o meio condicionado, valores se mantiveram inalterados nas combinações



Figura 3 - Interação entre fluconazol e o meio condicionado de P. aeruginosa sobre C. auris 467/15 . Este isolado apresentou CIM para fluconazol > 32 µg/mL. Na presença de 12,5 µg/mL de meio condicionado, a CIM do fluconazol foi reduzida para 4,0 µg/mL

CÓDIGO: SB0868

AUTOR: PEDRO VINICIUS MEDEIROS DIAS

ORIENTADOR: SUSANA MARGARIDA GOMES MOREIRA

TÍTULO: Manutenção de linhagens de Salmonella Typhimurium para aplicação no teste de reversão bacteriana com amostras ricas em polissacarídeos sulfatados extraídos de algas

Resumo

A manutenção adequada de linhagens bacterianas é essencial para a confiabilidade dos resultados no teste de reversão bacteriana (Teste de Ames). Neste contexto, foram realizadas atividades de manutenção e padronização das linhagens de Salmonella Typhimurium (TA98, TA100 e TA102), incluindo a verificação periódica do genótipo, a avaliação da taxa de reversão espontânea e a renovação dos estoques de uso rotineiro, com o objetivo de preparar o sistema para a avaliação do potencial mutagênico de amostras ricas em polissacarídeos sulfatados (PS) com potencial osteogênico extraídos de macroalgas. A cepa TA98 permaneceu estável durante todo o período, mantendo-se dentro dos intervalos de referência da literatura. A cepa TA100 apresentou uma tendência decrescente nos valores de colónias revertentes espontâneas entre 2025 e 2026, o que levou a um procedimento de padronização no nosso laboratório com base nos dados de 2026, estabelecendo-se novos intervalos de referência (185–250 e 170–270 CFU/placa). A cepa TA102, por outro lado, continua apresentando instabilidade nos valores de reversão espontânea, mesmo após a aquisição de novos estoques; portanto, sua aplicação em ensaios encontra-se suspensa até a identificação da causa. Além disso, foi realizado um ensaio preliminar de mutagenicidade com quatro concentrações de amostras de PS, na cepa TA98, na ausência de ativação metabólica, cujo resultado preliminar indica ausência de efeito mutagênico, necessitando repetição para assegurá-lo.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, Biomateriais, Mutagenicidade, Teste de Ames;

TITLE: Maintenance of Salmonella Typhimurium strains for application on bacterial reverse mutation assay with samples rich in sulfated polysaccharides extracted from seaweed

Abstract

The proper maintenance of bacterial strains is essential for the reliability of results in the bacterial reverse mutation test (Ames Test). In this context, maintenance and standardization activities of Salmonella Typhimurium strains (TA98, TA100, and TA102) were carried out, including periodic genotype verification, assessment of spontaneous reversion rates, and routine stock renewal, aiming to prepare the system for evaluating the mutagenic potential of sulfated polysaccharide SP-rich samples with osteogenic potential extracted from seaweeds. The TA98 strain remained stable throughout the period, staying within the literature reference ranges. The TA100 strain showed a decreasing trend in spontaneous revertant values between 2025 and 2026, leading to an internal standardization procedure based on 2026 data, establishing new control intervals (185–250 and 170–270 CFU/plate). The TA102 strain, on the other hand, continues to show instability in spontaneous reversion values, even after acquiring new stocks, and its application in assays is suspended until the cause is identified. Additionally, a preliminary mutagenicity assay was performed with four concentrations of SP-rich samples, on the TA98 strain, in the absence of metabolic activation, whose preliminary result indicates the absence of mutagenic effects, requiring repetition to assure the result.

Keywords: Ames Test, Biocompatibility, Biomaterials, Mutagenicity;

Introdução

Para a avaliação inicial do potencial mutagênico de amostras, deve-se realizar o teste de reversão bacteriana (OECD TG471, 2020; Baldrick et al., 2021). Esse ensaio apresenta baixo custo e alta sensibilidade para detectar potenciais efeitos cancerígenos, espelhando testes em mamíferos com alta taxa de concordância (Zeiger, 2023; Arriaga et al., 2025). O ensaio de reversão bacteriana consiste na utilização de cepas de bactérias, em especial de Salmonella enterica Typhimurium, com mutações que as tornam auxotróficas para o aminoácido histidina, tornando-as dependentes desse aminoácido para crescer (Ames et al., 1973; Salvadori et al., 2021).

A detecção de uma elevada taxa de colônias que reverteram a mutação de auxotrofia comparada com os padrões de manutenção seria um indicativo de resultado positivo, assumindo que a amostra possui substâncias capazes de induzir uma mutação secundária que reverteu a mutação primária (Zeiger et al., 2023). A utilização de múltiplas cepas é uma recomendação da OECD para que a determinação da mutagenicidade possa detectar diferentes tipos de danos genéticos, utilizando-se pelo menos uma cepa que detecte substituições de pares de bases GC no sítio primário da mutação, como a TA98 e a TA100, e outra cepa que identifique substituições de pares de bases AT no sítio primário da mutação, como a TA102 (OECD TG471, 2020).

No ensaio, foi realizada uma adaptação do ensaio de microssuspensão de Salmonella, que permite avaliar os efeitos mutagênicos com sensibilidade utilizando menor quantidade de amostra e reagentes (Kado et al., 1983; Salvadori et al., 2021). A manutenção das cepas no laboratório e o padrão de colônias revertentes espontâneas são fundamentais para estabelecer os intervalos de valores padronizados para cada cepa. Esses intervalos são fundamentais para validar o resultado de um ensaio com amostras, porque se faz a comparação entre a reversão induzida nas bactérias pela amostra eos

valores de revertentes espontâneas (Kristien Mortelmans, 2019; OECD TG471, 2020; Daisy Salvadori et al., 2021; Myriam Arriaga et al., 2025).

A aplicação dos polissacarídeos sulfatados (PS) como moléculas bioativas tem sido alvo de investigação devido à comprovação de efeitos com potencial terapêutico, como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticoagulantes, antitumorais, entre outros (Guan et al., 2026; Jager et al., 2026).

No nosso grupo de pesquisa temos investigado o potencial osteogênico desses compostos. Especialmente, de amostras ricas em PS extraídos de algas marinhas verdes (Chaves et al., 2022; Rodrigues et al., 2026). Inicialmente, o projeto previa a avaliação da mutagenicidade de PS da alga verde C. cupressoides. No entanto, surgiu como prioridade avaliar a atividade mutagênica de amostras de carragenana iota, que são PS de macroalgas vermelhas, que também estão sendo avaliadas quanto ao seu potencial osteogênico em trabalhos no grupo.

De qualquer modo, qualquer possível aplicação biomédica requer uma caracterização aprofundada dos compostos presentes na amostra, desde a estrutura até a sua interação com o organismo, para determinar a biocompatibilidade e bioatividade (Olegovna et al., 2022; Benhniya et al., 2026). Apesar de os estudos apresentarem uma tendência de biocompatibilidade para polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas (Alfinaikh et al., 2025), cada composto tem estrutura única e precisa de elucidação sobre sua interação com o organismo a longo prazo, em especial no contexto do potencial cancerígeno; portanto, nesse trabalho se começou a avaliação preliminar do potencial mutagênico dessas amostras.

Metodologia

MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Os estoques permanentes das cepas são mantidos a -80 °C durante um período entre 6 meses e 1 ano no máximo, a partir do qual são preparados os estoques de uso rotineiro para a aplicação de ensaios. Os estoques de uso rotineiro são mantidos em placas de Petri (Máster) de ágar mínimo (ágar glicose e solução de sais Vogel Bonner “E” 10x) com histidina, biotina e antibióticos (para os quais a cepa é resistente) a 4 °C, durante um período máximo de 2 meses (2 semanas para a TA102). A renovação dos estoques de uso rotineiro é essencial para garantir o genótipo funcional das cepas para um resultado confiável dos ensaios com amostras (Norman Kado et al., 1983; Cetesb L5.241, 1994).

Durante os procedimentos de renovação, foi preparado um inóculo inicial de 20 mL de caldo nutriente, com antibiótico ao qual a cepa é resistente, que foi incubado com agitação a 180 RPM e 37 °C, por 16 horas. Depois, os inóculos foram semeados de forma a isolar colônias, sendo novamente incubados em placas de ágar nutriente por 20 horas, a 37 °C. Novamente, colônias aptas foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de caldo nutriente durante 16 horas, a 37 °C, com agitação. Os inóculos em caldo nutriente foram acompanhados de controles negativos para excluir contaminações. A partir do inóculo final de 5 mL, a bateria de testes foi realizada, plaqueando a bactéria em

diversas placas para testar o genótipo esperado de cada cepa.

As placas que permitem avaliar a dependência a histidina e biotina foram preparadas em ágar mínimo para verificar o crescimento apenas na placa em que a histidina e a biotina foram adicionadas, enquanto o crescimento na placa que possuía apenas biotina não era esperado. Além disso, foram realizados outros testes. Foi avaliada 1) a sensibilidade à mutação UVrB 2) a resistência a um antibiótico específico, como ampicilina (conferida pelo plasmídeo pKM101) para a maioria das cepas resistentes e ampicilina e tetraciclina (conferida pelo plasmídeo pAQ1) para a TA102; 3) a sensibilidade à mutação RFA que torna a membrana lipopolissacarídica (LPS) das bactérias mais permeável. Esses testes foram realizados em placas de ágar mínimo (dependência de biotina e histidina) e em placas de ágar nutriente (RFA, UVrB, presença dos plasmídeos pAQ1 e pKM101) que foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

Além da verificação do genótipo, foi realizada a avaliação da taxa de reversão espontânea das cepas, em placas de ágar mínimo contendo histidina e biotina em baixas concentrações em top ágar (bacto ágar e NaCl) a 45 °C e com o pH mais próximo de 7. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 48 a 72 horas. Após esse período, foi realizada a contagem de colônias isoladas e esse valor foi comparado ao intervalo padrão relatado na literatura.

PADRONIZAÇÃO DOS INTERVALOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a padronização dos valores obtidos nas renovações, foi realizado o teste estatístico de one-way ANOVA entre os grupos com os dados organizados por inóculo de cada procedimento de renovação, com significância de $p < 0,05$. Além disso, também se realizaram os testes t de Welch entre os valores de 2025 e os de 2026 para diferenciar os resultados obtidos nos diferentes ensaios. A formulação do novo intervalo padrão levou em conta a os resultados de 2026 utilizando os testes de ANOVA one-way e Kruskal-Wallis para determinar estabilidade, visto que os valores na literatura servem como referência e não como padrão estrito (Dan Levy et al., 2019; Daisy Salvadori et al., 2021; Olga Egorova et al., 2024).

A interpretação e análise dos resultados de ensaios se baseia na razão de mutagenicidade (RM) que consiste em RM=E/C, na qual "E" se refere à soma das colônias revertentes espontâneas e induzidas (placa teste) e "C" se refere às colônias revertentes espontâneas (controle negativo). O resultado dos ensaios é validado como positivo quando é confirmada que a relação entre as revertentes induzidas e as revertentes espontâneas é de pelo menos duas vezes, sendo feita também uma análise estatística para relacionar a dose-resposta das colônias revertentes com a quantidade de amostra exposta às bactérias (função entre concentração e número de revertentes) a fim de tornar o resultado do ensaio mais confiável e relevante. Além disso, o número de revertentes obtido nos ensaios deve ser comparado com o histórico laboratorial para verificar se qualquer alteração é justificada em relação aos dados de rotina do laboratório (Cetesh L5. 241, 1991; Dan Levy et al., 2019; Olga Egorova et al., 2024).

ENSAIO DE MUTAGENICIDADE

A partir das placas de uso rotineiro “Máster”, foi realizado um inóculo de 20 mL com caldo nutriente que foi incubado, com agitação a 180 RPM e 37 °C, por 16 horas. Esse

inóculo é centrifugado a 4000 RPM, 4°C por 10 minutos e ressuspendido em 4mL de tampão fosfato.

Após centrifugar a cultura, prepararam-se os tubos de ensaio para a pré-incubação da cultura que foi exposta às amostras em quatro concentrações diferentes: 10µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL e 0,1µg/placa de 4-NQO, como mutágeno do controle positivo, por 90 minutos a 37 °C. Nos tubos de ensaio, foram incubados 50 µL da cultura com 50 µL de tampão fosfato e 5 µL da amostra, sendo usados 2 µL de mutágeno nos controles (Norman Kado et al., 1983). Durante a pré-incubação, foram preparadas diluições seriadas da cultura, sendo inoculados 100 µL da diluição final (de fator 10-7) e distribuídos em placas de ágar nutriente com auxílio de beads de sílica. Depois, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para contagem de CFU/mL.

Em seguida, nos tubos de ensaio da pré-incubação foram adicionados 2,5 mL de ágar de superfície fundido estabilizado a 45 °C e agitados para serem vertidos sobre placas com ágar mínimo antes de serem incubadas a 37 °C por 48-72 h. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias revertentes das placas com amostra e comparada com a contagem das colônias nas placas de controle negativo para calcular a razão mutagênica (RM).

Resultados e Discussões

Durante a manutenção do genótipo das cepas, realizada nos procedimentos de renovação, o genótipo das três cepas TA98, TA100 e TA102 foi verificado seguindo os protocolos de testes fenotípicos recomendados para o ensaio. Conforme se visualiza na Figura 1, o genótipo das três cepas foi testado fenotipicamente, e é possível confirmar nas Fig. 1A e 1B a presença dos plasmídeos pKM101 e pAQ1, respectivamente, pela verificação da resistência conferida pelos plasmídeos observada nas estrias de ampicilina e tetraciclina em cada placa . Já na placa da Fig. 1C se pode verificar a presença da mutação RFA, responsável por tornar a camada lipopolissacarídica dessas bactérias mais fina e permeável, conferida pela inibição do crescimento na presença do corante cristal violeta (Salvadori et al., 2021). Além disso, a placa da Fig. 1D avalia a mutação uvrB que torna as cepas que a possuem (TA98 e TA100) mais sensíveis à luz UV pela retirada do gene responsável pelo reparo por excisão de bases em caso de dano genético (mutação ausente na TA102), enquanto as placas da Fig. 1E e 1F checam a auxotrofia da linhagem para histidina, mutação essencial para a avaliação de mutagenicidade (CETESB, 1991). Todos os testes passaram nos requisitos para conferir o genótipo de cada cepa, o que a levou ao seu estoque e à validação para serem usadas nos testes com as amostras.

Para avaliar a padronização dos valores obtidos nas renovações, foram excluídos os valores outliers e os seus estoques permanentes foram descartados para evitar renovar a partir deles. Realizaram-se os testes estatísticos de one-way ANOVA com os dados das renovações e incluíram-se os resultados obtidos em um ensaio de sensibilidade da cepa TA100 que foi realizado.

Inicialmente, o teste indicou diferenças estatisticamente significativas nas diferentes manutenções realizadas, $p < 0,05$ ($p = 1,31 \times 10^{-7}$), mostrando a não reprodutibilidade

dos resultados, mas seguindo um padrão decrescente no número de colônias revertentes espontâneas. Além disso, foi possível perceber diferenças estatísticas entre dois grupos de resultados : os obtidos em 2025 e os obtidos em 2026, como observado no gráfico da Figura 2.

Com base nesses achados, utilizando-se os dados dos ensaios de 2026, observou-se uma estabilização dos resultados sem diferenças estatisticamente significativas, podendo-se incluir um intervalo de segurança de 185-250 e um intervalo aceitável entre 170-270, conforme os dados da Figura 3 (média ±15% e média ±30%). Apesar dos valores estabelecidos, o monitoramento da tendência dos ensaios de 2026 para as manutenções da TA100 continuará a ser realizado para manter os intervalos confiáveis e confirmar a estabilidade do novo padrão estabelecido (Dan Levy et al., 2019; Daisy Salvadori et al., 2021; Olga Egorova et al., 2024).

Além disso, a cepa TA98 tem mantido valores de colônias revertentes dentro dos valores da literatura, com a média das renovações, mais ou menos dois desvios-padrão, ficando próxima dos valores da literatura (24,3-74,7 vs 25-75, respectivamente) (Salvadori et al., 2021; Cetesb L5.241, 1991). As variações entre ensaios não apresentam tendência estatisticamente significativa e são aleatórias, mantendo-se dentro do intervalo padrão.

Mesmo com a aquisição de novos estoques da cepa TA102, a qual não apresentou crescimento estável dentro dos intervalos da literatura nem entre os resultados dos diferentes ensaios realizados no laboratório, os resultados seguem destoantes entre si, conforme mostrado na Figura 4. A manutenção da cepa continuará, mas sua aplicação em ensaios não será realizada, a fim de manter a cepa e alterar condições experimentais para encontrar a causa desse problema, visto que é renovada nas mesmas condições que as outras cepas e seu estoque rotineiro de uso para ensaios nunca permanece por mais de duas semanas. Essa cepa é essencial para resultados robustos que corroborem os padrões da OECD, visto que ela apresenta sensibilidade a mutações de troca de bases AT no sítio primário da mutação de auxotrofia para histidina (Kristien Mortelmans, 2019; Daisy Salvadori et al., 2021).

Amostras ricas em polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas têm sido investigadas pelo seu potencial efeito osteogênico. Essas amostras foram testadas na cepa TA98 na ausência de ativação metabólica e trata-se ainda de um resultado preliminar, faltando a repetição para garantir resultado confiável, além de sua execução com ativação metabólica. Entretanto, os resultados preliminares indicam ausência de efeito mutagênico nas 4 concentrações testadas com $p>0,05$, com uma razão mutagênica (Colônias Revertentes Induzidas/Colônias Revertentes Espontâneas) inferior a 2 em todas as concentrações testadas.

Conclusão

A padronização dos resultados para a cepa TA100 estabelece um grupo específico de dados em 2026, o qual será utilizado como padrão na avaliação nos ensaios. Já a cepa TA98 segue sem alterações quer no genótipo quer nas colônias revertentes espontâneas

em sua manutenção e permanece dentro dos valores esperados. O ensaio realizado com as amostras na TA98 está incompleto, mas indica ausência de efeitos mutagênicos na ausência de ativação metabólica, o que será caracterizado futuramente.

A cepa TA102 continua apresentando instabilidade nos resultados de reversão espontânea mesmo após a aquisição de estoques novos, portanto, sua manutenção e monitoramento seguirão sem aplicação em ensaios no momento. Seu genótipo está de acordo com a literatura, porém sua reversão espontânea varia entre crescimento excessivo e crescimento mínimo, sugerindo outro fator que esteja influenciando estes resultados e exigindo mais testes para validar seu funcionamento.

Referências

1 Alfinaikh, R.S., Alamry, K.A., & Hussein, M.A. (2025). Sustainable and biocompatible hybrid materials-based sulfated polysaccharides for biomedical applications: a review. RSC Advances, 15(6), 4708-4767. https://doi.org/10.1039/d4ra07277d

2 Ames, B.N., Lee, F.D., & Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70(3), 782-786. https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.782

3 Arriaga-Alba, M., Montero, R., & Aguirre, J. (2012). The Ames test in twenty-first century. Journal of Toxicology, 2, 23-37.

4 Baldrick, P. (2021). Genotoxicity test battery - An assessment of its utility in early drug development. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 868-869, 503388. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503388

5 Benhniya, B., et al. (2026). Bioactive Sulfated Polysaccharides from Green Algae Codium tomentosum Stackhouse, 1797: Structural Characterization and Therapeutic Potential. International Journal of Molecular Sciences, 27, 4848. https://doi.org/10.3390/ijms27114848

6 CETESB. (1991). Norma L5.241: Teste de Kado - Ensaio de microssuspensão com Salmonella typhimurium - Método de ensaio. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

8 Egorova, O.V., & Ilyushina, N. (2024). Standardization of criteria for interpreting the results of mutagenesis assessment in the Ames test. Toxicology Gazette, 32(5), 313-321. https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-313-32.32-321

9Chaves Filho GP, Lima MEGB, Rocha HAO, Moreira SMG. Role of sulfated polysaccharides from seaweeds in bone regeneration: A systematic review. Carbohydr Polym. 2022 May 15;284:119204. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119204. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35287916.

10Guan, Y., et al. (2026). Green Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae: Chemistry, Pharmacological Activities, and Biotechnological Applications. Marine Drugs, 24, 198. https://doi.org/10.3390/md24060198

11 Jäger, R., et al. (2026). Effect of an Ulva lactuca Extract on Systemic Antioxidant and Inflammatory Biomarkers in Healthy Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Nutrients, 18, 2244. https://doi.org/10.3390/nu18142244

12 Kado, N.Y., Langley, D., & Eisenstadt, E. (1983). A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. Mutation Research, 121(1), 25-32. https://doi.org/10.1016/0165-7992(83)90082-9

13 Levy, D.D., Zeiger, E., Escobar, P.A., Hakura, A., van der Leede, B.J., Kato, M., Moore, M.M., & Sugiyama, K. (2019). Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 848, 403074. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004

14 Mortelmans, K. (2019). A perspective on the development of the Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 841, 14-16. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.004

15Norman Y. Kado, Donna Langley, Eric Eisenstadt, A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, Mutation Research Letters, Volume 121, Issue 1, 1983, Pages 25-32, ISSN 0165-7992, https://doi.org/10.1016/0165-7992(83)90082-9.

16 OECD. (2020). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). OECD Publishing. https://doi.org/10.1787/9789264071247-en

17 Olegovna, Z.O., Sergushkina, M.I., Khudyakov, A.N., Polezhaeva, T.V., & Solomina, O.N. (2022). Seaweed sulfated polysaccharides and their medicinal properties. Algal Research, 68, 102885. https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102885

18 Salvadori, D.M.F., Takahashi, C.S., Grisolia, C.K., & Santos, R.A. (2021). Da Toxicogenética à Toxicogenômica (1ª ed., pp. 84-112). ISBN 978-65-5586-335-2.

19Victor M. Rodrigues, Pablo F.F. Farias, Augusto M. Souza, Ana C. Luchiari, Hugo A.O. Rocha, Susana M.G. Moreira, Sulfated polysaccharides from Caulerpa sertularioides promote bone regeneration in hMSC-WJ and zebrafish models, Algal Research, Volume 94, 2026, 104552, ISSN 2211-9264, https://doi.org/10.1016/j.algal.2026.104552.

20 Zeiger, E. (2019). The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 841, 43-48. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007

21 Zeiger, E. (2023). Determination of a positive response in the Ames Salmonella mutagenicity assay. Environmental and Molecular Mutagenesis, 64(4), 250-258. https://doi.org/10.1002/em.22538

Anexos



Figura 1 • TA98, * TA100 e ▲ TA102. A) Plasmídeo pKM10; B) Plasmídeo pAQ1; C) Mutação RFA; D) Mutação UVrB; E) Histidina+ e F) Histidina-.



Figura 2 Colônias revertentes espontâneas das renovações da cepa TA100 nos ensaios realizados entre 2025 e 2026. Pontos Vermelhos: Ensaio de Manutenção; Pontos Azuis: Ensaio de Sensibilidade.



Figura 3 Colônias revertentes espontâneas dos ensaios de 2026 (renovação + controles negativos do ensaio de sensibilidade).



Figura 5 Resultados da média de colônias revertentes espontâneas por renovação da cepa TA102 ao longo do tempo.



Figura 4 Colônias revertentes espontâneas das renovações da cepa TA98 ao longo do tempo (2025-2026). Cada ensaio (por cor) foi realizado em duplicata (dois pontos) para cada renovação.



Figura 6 Resultados da avaliação da mutagenicidade das amostras ricas em PS (carragenina iota) com a cepa TA98, sem ativação metabólica. Foram testadas 4 concentrações da amostra (10-200 µg/mL).

CÓDIGO: SB0869

AUTOR: ANA BEATRIZ REVOREDO GALVÃO

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: ESTUDO DOS TRANSTORNOS GASTROINTESTINAIS EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE EHLERS-DANLOS

Resumo

A Síndrome de Ehlers-Danlos é uma síndrome genética rara e subdiagnosticada descrita primariamente por Hipócrates no ano 400 antes de Cristo e, após uma descrição mais detalhada da síndrome, recebeu o nome dos médicos que fizeram essa caracterização. Tal condição surge por uma mutação genética que interfere na formação de componentes da matriz extracelular como a proteína de colágeno, levando a desordens em todo o corpo, incluindo a parte gastrointestinal, como refluxo gastroesofágico e disfagia. O grupo de pesquisa focado em estudar a síndrome de Ehlers-Danlos na UFRN deu continuidade à parceria com a Associação Brasileira de Pessoas com Síndromes de Ehlers-Danlos e Transtornos do Espectro de Hipermobilidade (ABRASED), o que possibilitou um maior alcance da divulgação científica pelo compartilhamento das postagens, além de ter facilitado o recrutamento de pessoas interessadas em participar da pesquisa pela divulgação do formulário. Para essa pesquisa foram realizadas 2 aplicações de recordatórios alimentares espaçados por 30 a 45 dias com um grupo de 30 indivíduos aptos a participar da pesquisa sendo convocados via e-mail. Esses dados seguem em coleta e tabulação para posterior análise estatística e escrita de um trabalho de conclusão de curso que está em andamento. Este trabalho é importante para maior conhecimento sobre a síndrome, além de avaliar o consumo dietético e a relação com os sintomas gastrointestinais dessa população.

Palavras-chave: Síndrome rara. Sintomas gastrointestinais. Consumo dietético.

TITLE: Study of gastrointestinal disorders in individuals with Ehlers-Danlos syndrome

Abstract

Ehlers-Danlos syndrome is a rare and underdiagnosed genetic syndrome described primarily by Hippocrates in the year 400 before Christ and, after a more detailed description of the syndrome, was named for the doctors who made this characterization. Such a condition arises from a genetic mutation that interferes with the formation of extracellular matrix components like collagen protein, leading to disorders throughout the body, including the gastrointestinal part, such as gastroesophageal reflux and dysphagia.

The research group focused on studying Ehlers-Danlos syndrome at UFRN has continued its partnership with the Brazilian Association of People with Ehlers-Danlos Syndromes and Hypermobility Spectrum Disorders (ABRASED), which enabled a greater reach of scientific dissemination by sharing the posts, as well as facilitating the recruitment of people interested in participating in the survey by disseminating the form. For this research, 2 applications of dietary recalls spaced for 30 to 45 days were carried out with a group of 30 individuals able to participate in the research being summoned via email. These data are collected and tabulated for subsequent statistical analysis and writing of a course completion work that is in progress. This work is important for greater knowledge about the syndrome, as well as to evaluate dietary consumption and the relationship with gastrointestinal symptoms of this population.

Keywords: Rare syndrome. Gastrointestinal symptoms. Dietary intake.

Introdução

A Síndrome de Ehlers-Danlos é uma síndrome rara e subdiagnosticada em todo o mundo, a qual possui uma prevalência estimada de 1 caso para 5000 indivíduos (Pyeritz R. E., 2000). Seu primeiro caso foi descrito pelo médico grego Hipócrates no ano 400 antes de Cristo como uma condição em que há múltiplas cicatrizes e frouxidão articular. Após isso, uma descrição mais detalhada foi apresentada pelo médico Tschernogubow no final do século XIX (Enersen, O. D., 2004; Parapia, L. A. e Jackson, C., 2008). Poucos anos depois, no início do século XX, os médicos dermatologistas Edvard Ehlers e Henri-Alexandre Danlos perceberam a existência de articulações hipermóveis, pele hiperextensível, formação anormal de cicatrizes e facilidade no aparecimento de hematomas, descrevendo as principais características da síndrome. O que levou ao nome da Síndrome de Ehlers-Danlos, dado pelo médico Frederick Parkes-Weber em 1936 (Malfait *et al*., 2020). De acordo com a Classificação Internacional da Síndrome de Ehlers-Danlos de 2017 definida pelo International EDS Consortium, há 13 subtipos classificados, além de outro descrito em artigo, porém que não foi incluído oficialmente na classificação até o momento (Blackburn *et al.*, 2018).

Essa síndrome é resultante de mutações em genes referentes à produção e à maturação de estruturas da matriz extracelular, como a proteína de colágeno (Miller, E. P. e Grosel, J. M., 2020). Devido ao colágeno ser uma proteína presente na composição de diversos tecidos corpóreos, conferindo funções de resistência, elasticidade e de suporte, problemas nessa proteína podem levar a fragilidade tecidual, logo, resulta em adversidades em todo o organismo, incluindo o trato gastrointestinal, como perfurações, desconfortos abdominais, refluxo gastroesofágico e disfagia (Al Sayed, A. e Sumrall, C, 2024; Zarate N. *et al.*, 2010).

Metodologia

Ao longo do ano, foi realizada a busca por artigos científicos sobre o tema estudado nas bases de dados PubMed, *Web of Science* e *Science Direct*. As informações obtidas na literatura científica foram utilizadas para a confecção de materiais de divulgação científica acerca da temática no perfil de *Instagram* @ehlersdanlos.ufrn, o qual é fruto do

projeto de extensão “Ações de Saúde para pessoas com a Síndrome de Ehlers-Danlos (SED), uma doença subdiagnosticada no Brasil”, organizado pelos mesmos componentes do grupo de pesquisa. Neste perfil são postadas semanalmente publicações que esclarecem as características e manejo da síndrome de Ehlers-Danlos com uma linguagem acessível, objetiva e de fácil entendimento para que pessoas com a síndrome e profissionais da saúde consigam compreender mais sobre o assunto, além de enxergar esse tema de forma mais prática, como por meio da rede social.
Após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Central da UFRN acerca da ampliação da pesquisa para participantes de todo o Brasil sob o parecer 7.271.532, foi disponibilizado um formulário online por meio do *Google Forms* com o fim de recrutar os interessados em participar da pesquisa. Este instrumento foi disponibilizado apenas por dois dias devido à alta demanda de respostas recebidas.
Desde então foram realizados recordatórios alimentares de 24 horas (R24h) em 2 aplicações sendo a segunda em um período de 30 a 45 dias após a primeira, a fim de verificar a alimentação habitual de pessoas com a síndrome e observar as implicações nos sintomas gastrointestinais.
As aplicações destes inquéritos alimentares foram realizadas por meio de uma reunião online no *Google Meet* com cerca de 30 minutos a 1 hora de duração, combinadas previamente via e-mail. Nas reuniões, o entrevistado é questionado sobre a sua alimentação do dia anterior por meio do Método de Passagens Múltiplas criado pelo Departamento de Agricultura do Estados Unidos (USDA) em 1999, composto pela listagem rápida inicial, verificação dos alimentos esquecidos, definição de horários e tipos de refeições, descrição detalhada do consumo e revisão final (Moshfegh, A. J. *et al.*, 2008).
Em maio desse ano, foram recebidas as tabelas necessárias para a tabulação e análise desses inquéritos alimentares, etapa que segue em andamento e que possui a finalidade de organizar os dados obtido para a elaboração do trabalho de conclusão de curso que avalia o consumo dietético e sua relação com os sintomas gastrointestinais de pessoas com a Síndrome de Ehlers-Danlos, o qual está em andamento.

Resultados e Discussões

A partir da continuidade da parceria do grupo Grupo de Pesquisa Ehlers-Danlos UFRN com a Associação Brasileira de Pessoas com Síndromes de Ehlers-Danlos e Transtornos do Espectro de Hipermobilidade (ABRASED), as postagens feitas semanalmente obtiveram um maior alcance, logo, uma maior divulgação científica, obtendo uma média de 9000 visualizações por postagem e chegando a mais de 20 mil visualizações em algumas delas, levando as informações sobre essa síndrome a diversos países, como Portugal, Estados Unidos e Canadá.
Além disso, após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Central da UFRN (CEP Central UFRN), o formulário de recrutamento de participantes foi divulgado novamente pelo grupo de pesquisa e pela associação parceira, sendo permitida a participação de pessoas com diagnóstico clínico ou genético da Síndrome de Ehlers-Danlos que tenham no mínimo 18 anos em todo o Brasil, o que resultou em um grande número de interessados, havendo 172 respostas em apenas 2 dias.
Após isso, a equipe contactou os indivíduos interessados em participar da pesquisa

através do e-mail para combinar o dia da realização dos recordatórios alimentares de 24 horas (R24h), os quais seguem sendo realizados com um total de 30 participantes em 2 aplicações com cada um para verificar a alimentação habitual.

Conclusão

Portanto, conclui-se que esta pesquisa sobre a Síndrome de Ehlers-Danlos é fundamental para a ampliação dos conhecimentos científicos dos profissionais de saúde e da população em geral, pois houve um grande crescimento no alcance dessas informações por meio do perfil de *Instagram* @ehlersdanlos.ufrn. Além disso, com a expansão da pesquisa para que pessoas de todo o Brasil possam participar, foi possível recrutar uma maior quantidade de indivíduos que se encaixam nos critérios de inclusão e realizar os recordatórios alimentares e a tabulação desses dados. Os próximos passos para o desenvolvimento dessa pesquisa são concluir a aplicação dos inquéritos alimentares, sua tabulação e realizar a análise estatística, tendo em vista que estes resultados serão utilizados para avaliar consumo dietético e sua relação com os sintomas gastrointestinais.

Referências

AL SAYED, A.; SUMRALL, C. Dermatologic, Orthopedic, and Cardiovascular Manifestations and Management in a Geriatric Patient With Dermatosparaxis-Type Ehlers-Danlos Syndrome: A Case Report. **Cureus**, 7 nov. 2024.

BLACKBURN, P. R. *et al*. Bi-allelic Alterations in AEBP1 Lead to Defective Collagen Assembly and Connective Tissue Structure Resulting in a Variant of Ehlers-Danlos Syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 4, p. 696–705, 5 abr. 2018.

ENERSEN, Ole Daniel. 2004. Ehlers-Danlos syndrome. **Whonamedit?** Disponível em: http://www.whonamedit.com/synd.cfm/2017.html.

MALFAIT, F. *et al*. The Ehlers–Danlos syndromes. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 30 jul. 2020.

MILLER, E.; GROSEL, J. M. A review of Ehlers-Danlos syndrome. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 33, n. 4, p. 23–28, abr. 2020.

MOSHFEGH, Alanna J. *et al*. 2008. The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intakes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, p. 324-332. Disponível em: https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.324.

PARAPIA, Liakat A.; JACKSON, Carolyn. 2008. Ehlers-Danlos syndrome: a historical review. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 1, p. 32-35. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.06994.x.

PYERITZ, R. E. 2000. Ehlers-Danlos syndromes. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. (Ed.). **Cecil textbook of medicine**. 21. ed. v. 1. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 1119-1120.

ZARATE, N. *et al*. 2010. Unexplained gastrointestinal symptoms and joint hypermobility: is connective tissue the missing link? **Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 3, p. 252-e78. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01421.x.

Anexos



Figura 1 - Capa de uma postagem do perfil de Instagram @ehlersdanlos.ufrn sobre "O que seu dentista precisa saber sobre a SEDh"



Figura 2 - Capa de uma postagem do perfil de Instagram @ehlersdanlos.ufrn sobre "Alterações respiratórias na Síndrome de Ehlers-Danlos"



Figura 3 - Início do formulário disponibilizado para recrutamento de participantes para a pesquisa



Figura 4 - Perguntas sobre o diagnóstico disponíveis no formulário



Figura 5 - Perguntas sobre a Escala de Beighton (escala de hipermobilidade) disponíveis no formulário



Figura 6 - Modelo do recordatório alimentar de 24 horas utilizado na coleta de dados nutricionais

CÓDIGO: SB0874

AUTOR: KATHELLY ISABELLE SILVA PEREIRA

ORIENTADOR: ALICE DE MORAES CALVENTE

TÍTULO: Avaliação da distribuição e conservação das Espécies de Cactaceae do Rio Grande do Norte

Resumo

A família Cactaceae se destaca nas discussões sobre conservação da biodiversidade pelo alto grau de endemismo. Este trabalho teve como objetivo analisar as espécies de Cactaceae nativas do Rio Grande do Norte, mapeando sua distribuição e estimando a Área de Ocupação (AOO) e a Extensão de Ocorrência (EOO), como subsídio para futuras avaliações de conservação segundo os critérios da IUCN. Foram analisadas 15 espécies, com registros de ocorrência obtidos nas plataformas JABOT, speciesLink e GBIF. Os mapas foram elaborados no QGIS e os valores de AOO e EOO calculados no GeoCAT. Os resultados preliminares evidenciaram diferenças na representatividade e distribuição das espécies no estado. Brasiliopuntia brasiliensis e Rhipsalis baccifera apresentaram apenas cinco registros cada, enquanto Melocactus natalensis e Melocactus ernestii apresentaram oito e seis registros, respectivamente, também com baixos valores de AOO e EOO. Algumas espécies apresentaram registros concentrados no litoral, associadas à ocorrência em ambientes de Restinga. Entretanto, o baixo número de registros não indica necessariamente baixa abundância ou declínio populacional, sendo necessário maior esforço amostral para determinar a distribuição real das espécies. Os dados obtidos constituem um panorama preliminar da distribuição das Cactaceae no estado e uma base para futuras avaliações de conservação.

Palavras-chave: Cactaceae. Distribuição geográfica. Conservação. Rio Grande do Norte.

TITLE: Assessment of the distribution and conservation of Cactaceae species in Rio Grande do Norte

Abstract

The Cactaceae family stands out in discussions about biodiversity conservation due to its high degree of endemism. This work aimed to analyze the Cactaceae species native

to Rio Grande do Norte, mapping their distribution and estimating the Area of Occupation (AOO) and Extent of Occurrence (EOO), as a basis for future conservation assessments according to IUCN criteria. 15 species were analyzed, with occurrence records obtained from the JABOT, speciesLink and GBIF platforms. The maps were created in QGIS and the AOO and EOO values were calculated in GeoCAT. Preliminary results showed differences in the representation and distribution of species in the state. Brasiliopuntia brasiliensis and Rhipsalis baccifera presented only five records each, while Melocactus natalensis and Melocactus ernestii presented eight and six records, respectively, also with low AOO and EOO values. Some species had records concentrated on the coast, associated with occurrence in Restinga environments. However, the low number of records does not necessarily indicate low abundance or population decline, requiring greater sampling effort to determine the real distribution of the species. The data obtained constitute a preliminary overview of the distribution of Cactaceae in the state and a basis for future conservation assessments.

Keywords: Cactaceae. Geographic distribution. Conservation. Rio Grande do Norte.

Introdução

O conhecimento acerca da flora e fauna de um território, bem como a sua biodiversidade é essencial para estabelecer áreas prioritárias para a conservação e, assim, garantir a preservação da diversidade regional e minimizar as ameaças de extinção. Desse modo, os estudos de floras fornecem importantes informações fenológicas, descrevem os padrões de distribuição das espécies e trazem dados sobre a conservação do táxon estudado (FUNK, 2006), além de servir de base para o monitoramento de uma determinada área e para a descrição de sua biodiversidade (CERQUEIRA, 2001).

Os cactos, nomenclatura associada às plantas pertencentes à família taxonômica Cactaceae, são predominantemente típicos de regiões áridas e semiáridas (BARBOSA et al., 2017), embora possam também ser encontrados em regiões tropicais, como a Mata Atlântica brasileira (FLORA DO BRASIL, 2020). No Brasil, essa família ocorre majoritariamente na região leste, sendo destaque no nordeste e parte do sudeste brasileiro (OLDFIELD, 1997).

As espécies de cactáceas apresentam alto grau de endemismo e são frequentemente dominantes nos ambientes que ocorrem, o que é de interesse para a conservação. Além disso, muitas espécies sofrem pressões antrópicas elevadas, com os cactos estando entre os grupos taxonômicos mais ameaçados dos táxons avaliados até o momento.Das espécies avaliadas, 31% das 1.478 estão ameaçadas de extinção (GOETTSCH et al., 2015), o que reflete uma preocupação urgente para elaboração de medidas de conservação do grupo.

Diante desse cenário, se faz necessário mais estudos focados em avaliar e mapear as espécies de cactos, por meio de levantamentos de flora em escala regional, a fim de descrever a situação do grupo em seu habitat e incentivar a elaboração de medidas de conservação ou restauração das espécies nativas ameaçadas. Pensando nisso, esse trabalho tem por objetivo realizar a avaliação das espécies de Cactaceae nativas do

estado do Rio Grande do Norte, enriquecendo as informações sobre a família, e contribuir com o conhecimento florístico do estado, bem como com a preservação de sua biodiversidade.

Metodologia

A identificação das espécies de Cactaceae presentes no estado do Rio Grande do Norte foi feita com base no guia 'Cactaceae do Rio Grande do Norte' (SOUZA; ROQUE; CALVENTE, 2020). Um trabalho recente de Taylor et al. (2025) eleva Melocactus violaceus subsp. natalensis (P.J. Braun & Esteves) ao nível de espécie, passando a ser denominada Melocactus natalensis (P.J.Braun & Esteves) N.P.Taylor. Essa mudança foi reconhecida pelo Plants of the World Online (Kew) e, por isso, incluímos Melocactus natalensis na lista de espécies de cactos do estado, juntamente com as espécies do guia, totalizando 15 espécies.

Para coleta dos registros de ocorrência das 15 espécies, utilizamos os dados de herbários disponíveis virtualmente, tanto na plataforma JABOT do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ, 2026) e da rede speciesLink (CRIA, 2026). Além disso, foi utilizado também a plataforma Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2026). A busca foi feita

Foram criados os mapas de distribuição das espécies na área do estado do Rio Grande do Norte utilizando o software QGIS, versão 3.16.7 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2021). Além disso, para cada espécie foram calculadas, a partir dos registros de ocorrência, a Extensão de Ocorrência (EOO) e a Área de Ocupação (AOO) por meio do Geospatial Conservation Assessment Tool (GeoCAT). Consultamos a literatura científica disponível nas plataformas de indexação de artigos para fundamentação teórica e interpretação dos resultados. A avaliação do status de conservação das espécies final, com base nos critérios e categorias da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2012), poderá ser realizada em uma pesquisa futura, uma vez que os resultados obtidos aindam precisam ser checados e validados.

Resultados e Discussões

Os resultados da pesquisa são de caráter preliminar, porém é possível discutir sobre a amplitude de distribuição das espécies, número de registros e sobre os valores de Área de Ocupação (AOO) e Extensão de Ocorrência (EOO) atribuídos às espécies e o que isso representa para a conservação de Cactaceae no Rio Grande do Norte.

As espécies Brasiliopuntia brasiliensis, Rhipsalis baccifera, Melocactus natalensis e Melocactus ernestii apresentaram os menores números de registros no Rio Grande do Norte pelos herbários virtuais. B. brasiliensis e R. baccifera possuem os menores números, ambas com 5 registros encontrados, enquanto Melocactus natalensis tem 8 e

Melocactus ernestii tem 6 registros. Consequentemente, os valores de AOO e EOO também foram baixos para essas espécies (Tabela 1). Há uma consideração a respeito de Melocactus natalensis que precisa ser feita uma verificação na determinação das espécies atribuídas como Melocactus natalensis e Melocactus violaceus para distinguir as exsicatas que possam ter sido determinadas equivocadamente e ainda não tiveram atualização após a publicação do artigo de Taylor et al. (2025).

Ademais, M. natalensis possui conhecida associação com ambientes de Restinga, com ocorrência em dunas fixas, semelhante a M. violaceus e C. fernambucensis (Taylor et al., 2025; ZAPPI et al., 2025). Isso justifica a concentração dos registros dessas espécies apenas no litoral do estado(NEPOMUCENO; MIRANDA; ALVES-ARAÚJO, 2022), e seus baixos registros ocorrem pela baixa ocorrência de coleta, já que se tratam de espécies vulneraveis e que, para herborizar, é necessário matar a planta inteira.

Por outro lado, R. baccifera é uma espécie epífita e ocorre em diversos biomas brasileiros (TORTORELLI; GONZAGA; PEIXOTO, 2025), isso torna a possibilidade dessa espécie ocorrer de forma mais dispersa pelo estado, mesmo se sua abundância ainda for baixa. O RN está no limite norte de distribuição dessa espécie, já que ela é comum em ambientes florestais mais umidos e sem sazonalidade tão marcada, e sua ocorrência no estado é mesmo rara.

Entretanto, o baixo número de registros encontrados sempre precisa ser analisado, pois não indica necessariamente que as espécies possuem, de fato, pouca ocorrência no estado ou que estão em menor número por resultado de declínio populacional contínuo.Este último é um dos subcritérios para o critério B da IUCN, que se baseia na distribuição geográfica restrita das espécies (IUCN, 2012; RIBEIRO; CAITANO, 2023), então, a avaliação criteriosa com a interpretação dos resultados e validaçao com especialistas e análise da literatura é fundamental antes de concluir a determinar do estado de conservação de uma espécie.

Os valores obtidos pelo cálculo de Área de Ocupação (AOO) e Extensão de Ocorrência (EOO) são apresentados na Tabela 1.

Conclusão

Essa pesquisa trouxe um panorama preliminar da distribuição das espécies de cactos nativas reconhecidas para o Rio Grande do Norte. Os resultados, ainda que não possam determinar os status de conservação das espécies, ilustram como essas espécies estão amostradas nos acervos científicos dos herbários, algumas tendo mais chances de serem encontradas em coletas de campo, mais bem distribuídas e dispersas pelos municípios do estado, outras com poucos registros ou com registros concentrados em uma região. Esses padrões podem instigar uma pesquisa posterior que sincronize as características e adaptações de cada espécie com sua respectiva representatividade amostral dos registros e interpretar, sob os critérios estabelecidos pela IUCN para distribuição geográfica, em qual categoria de conservação cada espécie está atualmente.

Referências

SOUZA, Amanda Cristina Dantas de; ROQUE, Alan de Araújo; CALVENTE, Alice. Cactaceae do Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2020. 2 p. Rapid Color Guides, n. 1263. Field Museum. Disponível em: https://science-fmnh.vercel.app/en/fieldguides/guides/guide/1263. Acesso em: 7 ago. 2026.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. JABOT: Banco de Dados da Flora Brasileira. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, [s.d.]. Disponível em: https://jabot.jbrj.gov.br/. Acesso em: 7 ago. 2026.

CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL (CRIA). speciesLink: rede de informação sobre biodiversidade. Campinas: CRIA, 2026. Disponível em: https://specieslink.net/. Acesso em: 7 ago. 2026.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. 2. ed. Gland; Cambridge: IUCN, 2012. 32 p. Disponível em: https://www.iucnredlist.org/resources/categories-and-criteria. Acesso em: 7 ago. 2026.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List Categories and Criteria: version 3.1. 2. ed. Gland; Cambridge: IUCN, 2012.

TAYLOR, Nigel P.; TELHE, Milena; OLSTHOORN, Gerardus; LOWRY, Martin. A taxonomic update for Melocactus in Eastern Brazil. Bradleya, v. 43, p. 115, 2025. DOI: 10.25223/brad.n43.2025.a12.

GBIF SECRETARIAT. GBIF occurrence download. [S. l.]: Global Biodiversity Information Facility, 2026. Disponível em: https://doi.org/10.15468/dl.dps4ka. Acesso em: 7 ago. 2026.

BARBOSA, Alex da Silva et al. Estrutura populacional e espacial de Cereus jamacaru DC. em duas áreas de caatinga do agreste da Paraíba, Brasil. Ciência Florestal, v. 27, n. 1, p. 315-324, 2017.

CERQUEIRA, Rui. Um sistema de monitoramento e inventário da biodiversidade terrestre do Brasil. Conservação e biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento (I. Garay e BFS Dias, eds). Vozes, Petrópolis, p. 147-149, 2001.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/ >. Acesso em: 16 de julho de 2020

FUNK, Victoria A. Floras: a model for biodiversity studies or a thing of the past?. Taxon, v. 55, n. 3, p. 581-588, 2006.

GOETTSCH, B. et al. High proportion of cactus species threatened with extinction. Nature Plants, v. 1, n. 10, p. 1–7, 5 out. 2015.

OLDFIELD, Sara et al. Cactus and succulent plants: status survey and conservation action plan. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), 1997.

RIBEIRO, Ricardo da Silva; CAITANO, Haissa de Abreu. Listas Vermelhas e os Métodos da IUCN: história, conceito, síntese atual e aplicações regionais. In: LOPES, A. S. (org.). XII Botânica no Inverno 2023. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2023. cap. 12, p. 175-195.

TORTORELLI, Ricardo Maximo; GONZAGA, Diego Rafael; PEIXOTO, Ariane Luna. Floristic and taxonomic diversity of Rhipsalis (Cactaceae) in Minas Gerais state, Brazil. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 76, e00382025, 2025. DOI: 10.1590/2175-7860202576058.

NEPOMUCENO, Álvaro; MIRANDA, Victor Santos; ALVES-ARAÚJO, Anderson. Flora of Itaúnas State Park, Espírito Santo, Brazil: Cactaceae. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 73, e01862019, 2022. DOI: https://doi.org/10.1590/2175-7860202273001.

ZAPPI, Daniela Cristina; ALBUQUERQUE-LIMA, Sinzinando; TAYLOR, Nigel P.; RIBEIRO, Igor Souza; AONA, Lidyanne Y. S. Cactos na Restinga: avanço do conhecimento e perspectivas para a conservação. Paubrasilia, Porto Seguro, v. 8, n. supl., e209s, 2025. DOI: 10.33447/paubrasilia.2025s.e0209s.

Anexos



Mapa 1 - Distribuição geográfica das espécies: A) Melocactus zehntneri; B) Brasiliopuntia brasiliensis; C) Pilosocereus catingicola; D) Pilosocereus chrysostele; E) Pilosocereus pachycladus; F) Rhipsalis baccifera; G) Tacinga subcylindrica; H) T. inamoena



Mapa 2 - Distribuição geográfica das espécies: I) Xiquexique gounellei; J) Tacinga palmadora; K) Melocactus violaceus: L) Melocactus natalensis; M) Melocactus ernestii; N) Cereus jamacaru; O) Cereus fernambucensis.



Tabela 1 - As categorias apresentadas na coluna “Categoria GeoCAT” correspondem à classificação preliminar indicada pela ferramenta com base nos valores de EOO e AOO e não representam a categoria final de risco de extinção das espécies.

CÓDIGO: SB0886

AUTOR: BIANCA LETÍCIA DANTAS DE OLIVEIRA

COAUTOR: HILARY BARROS DE CARVALHO

COAUTOR: ALANNY CAMILE CORDEIRO DE MELO

ORIENTADOR: NAIANNE KELLY CLEBIS

TÍTULO: ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO FITOTERÁPICO COM Rhus toxicodendron (RT) SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO RIM DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA.

Resumo

Artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada por inflamação sistêmica, podendo causar nefropatias e insuficiência renal. Este estudo avaliou os efeitos da artrite induzida por adjuvante e do tratamento com Rhus toxicodendron sobre aspectos morfofuncionais renais, por meio da análise de parâmetros antropométricos, morfometria glomerular e fibrose renal. Foram utilizados 20 ratos machos Holtzman, distribuídos em quatro grupos (n=5): controle (C), artrítico (A), artrítico tratado com Rhus toxicodendron D9 (RT-D9) e artrítico tratado com ibuprofeno (A-Ib). Após 28 dias, os rins foram coletados, processados e corados com HE, PAS e Tricrômico de Masson. Os resultados preliminares (média±erro padrão; $p<0,05$) mostraram peso corporal e renal semelhantes entre os grupos. A densidade glomerular aumentou e a área glomerular diminuiu em todos os artríticos em relação ao controle, sem diferenças entre os tratamentos. A espessura da cápsula glomerular foi maior no grupo A que no C; entre os artríticos, RT-D9 apresentou a maior média e A-Ib valores semelhantes ao A. A área do tufo glomerular foi reduzida no grupo A em relação ao C; RT-D9 apresentou maior média entre os artríticos, sem diferença significativa. O espaço urinário aumentou no grupo A em comparação ao C, sendo menor em RT-D9 e A-Ib. A área mesangial foi reduzida no grupo A e aumentou significativamente em RT-D9 e A-Ib dentre os artríticos, com maior valor no RT-D9.

Palavras-chave: Artrite reumatoide; Rim; Fitoterapia; Morfofisiologia renal.

TITLE: Effects of herbal treatment with Rhus toxicodendron on renal morphology in rats with induced arthritis

Abstract

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease characterized by systemic inflammation that may cause nephropathies and renal failure. This study evaluated the effects of adjuvant-induced arthritis and Rhus toxicodendron treatment on renal morphofunctional aspects through anthropometric parameters, glomerular morphometry, and renal fibrosis. Twenty male Holtzman rats were divided into four groups: control (C), arthritic (A), arthritic treated with Rhus toxicodendron D9 (RT-D9), and arthritic treated with ibuprofen (A-Ib). After 28 days, kidneys were collected, processed, and stained with HE, PAS, and Masson's trichrome. Preliminary results (mean±standard error; $p<0.05$) showed similar body and renal weights among groups. Glomerular density increased and glomerular area decreased in all arthritic groups compared with C, with no differences among treatments. Glomerular capsule thickness was greater in A than C; among arthritic groups, RT-D9 showed the highest mean, while A-Ib was similar to A. Glomerular tuft area decreased in A compared with C, while RT-D9 showed the highest mean among arthritic groups, without significant difference. Urinary space increased in A compared with C and was lower in RT-D9 and A-Ib. Mesangial area decreased in A and significantly increased in RT-D9 and A-Ib, with the highest value in RT-D9.

Keywords: Rheumatoid arthritis; Kidney; Phytotherapy; Renal morphology.

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica e inflamatória crônica que acomete principalmente as membranas sinoviais das articulações, podendo provocar destruição óssea e cartilaginosa, deformidades e comprometimento funcional. Além das manifestações articulares, a inflamação sistêmica crônica pode afetar outros órgãos e contribuir para o desenvolvimento de comorbidades, comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (KAPOOR; BATHON, 2018; ALETAHA et al., 2010). O diagnóstico e o tratamento precoces são fundamentais para modificar o curso da doença. Atualmente, o tratamento inclui anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticóides, drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) e agentes biológicos (MOTA et al., 2012).

O acometimento renal pode ocorrer na AR como consequência, tanto da própria inflamação sistêmica, quanto da exposição prolongada aos medicamentos utilizados em seu tratamento. Entre as alterações renais descritas estão glomerulonefrite proliferativa mesangial, nefropatia membranosa, nefropatia por IgA, nefrite intersticial e amiloidose secundária, podendo ser afetados glomérulos, túbulos, interstício e vasculatura renal (HICKSON et al., 2014). Os AINEs, como o ibuprofeno, merecem atenção nesse contexto, pois a inibição das enzimas ciclooxigenases reduz a síntese de prostaglandinas importantes para a manutenção do fluxo sanguíneo renal, podendo favorecer lesões renais, especialmente com o uso prolongado (GAMBARO; PERAZELLA, 2003; KRAUSE et al., 2005). Assim, a investigação de alterações morfológicas renais associadas à artrite e ao tratamento farmacológico é relevante para a compreensão das repercussões sistêmicas da doença.

Modelos experimentais são importantes para o estudo da fisiopatogênese da AR e para a avaliação de estratégias terapêuticas. Entre os modelos utilizados, destaca-se a artrite

induzida por adjuvante (AIA), na qual o Adjuvante Completo de Freund (ACF) promove uma resposta inflamatória sistêmica em ratos, reproduzindo características observadas na AR humana, como edema articular, infiltração de células inflamatórias e degradação da cartilagem (BENDELE, 2001). A AIA apresenta rápida evolução e é amplamente utilizada em estudos pré-clínicos por sua facilidade de reprodução e capacidade de induzir alterações inflamatórias características (BOLON et al., 2010).

Embora os AINEs sejam eficazes no controle da dor e da inflamação, seus possíveis efeitos adversos sobre o rim estimulam a busca por alternativas terapêuticas. Nesse contexto, destaca-se o uso de substâncias de origem vegetal. Rhus toxicodendron (RT) é utilizada na terapia homeopática de condições inflamatórias e dores reumáticas, apresentando estudos experimentais que relatam efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e antiartríticos (SANTOS et al., 2007; PATIL et al., 2009a; PATIL et al., 2011).

Diante disso, considerando a possibilidade de comprometimento renal associado à artrite e ao seu tratamento, torna-se relevante investigar as alterações morfofuncionais do rim em um modelo experimental de artrite induzida por ACF, bem como verificar os possíveis efeitos dos tratamentos com Rhus toxicodendron sobre o tecido renal.

Metodologia

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs da UEM (parecer nº113/2013) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN (parecer nº 066/2019 - isento). O certificado de análise das plantas foi garantido pela empresa Schraibmann LTDA (Carapicuíba, SP). As formulações homeopáticas foram preparadas conforme a farmacotécnica descrita na farmacopéia homeopática brasileira 3ª edição.

Animais

Foram utilizados nesta pesquisa 20 ratos machos adultos (81 dias de idade) da linhagem Holtzman (Rattus norvegicus) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Os animais foram mantidos dos 50 aos 53 dias de idade (período de adaptação) em caixas de polipropileno no biotério do Departamento de Farmácia da UEM, com temperatura de 22±2ºC, ciclo de 12/12 horas de claro/escuro e receberam água e ração ad libitum Nuvilab (Nuvital, Colombo, PR, Brasil) (peso médio dos animais foi de 208,4±12,6g). Após esse período, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5): Grupo C, controle, sem indução da artrite; Grupo A, artrítico, sem tratamento; Grupo RT-D9, artrítico, tratado com Rhus toxicodendron na diluição D9; e Grupo A-Ib, artrítico, tratado com ibuprofeno.

Design experimental para indução da artrite

Os animais dos grupos artríticos foram induzidos à artrite por dose única de injeção subcutânea de 100 µL de suspensão de ACF® - Adjuvante completo de Freund (Sigma-

Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), na região plantar da pata posterior esquerda. Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, porém foi administrado 0,1mL do veículo (óleo mineral) (Nujol®, Schering-Plough, São Paulo, Brasil) sem o agente indutor da artrite.

Tratamento

No dia após à indução da artrite por ACF teve início o tratamento fitoterápico, o qual teve duração de 28 dias. A formulação de Rhus toxicodendron foi preparada segundo a farmacotécnica homeopática. Para a obtenção da diluição na potência D9, foi utilizada a razão de 1:10 da tintura mãe (solução hidro alcoólica de estocagem do ativo) em solução hidro alcoólica à base de álcool de cereais, seguida de cem sucções (dinamizações). A solução obtida e demais soluções foram diluídas em solvente hidro alcoólico à base de álcool de cereais na razão 1:10 e succucionadas por 100 vezes até a obtenção da razão final de 1:109 que corresponde a potência D9.

A administração da Rhus toxicodendron do grupo RT-D9 foi realizado por gavagem (2x/dia), sendo a primeira às 8h00m e a segunda às 11h00m da manhã, sendo o volume administrado em cada uma delas de 0,1mL, totalizando 0,2mL ao dia. Os animais dos grupos C e A receberam 0,2mL do veículo da formulação (álcool de cereais), seguindo o mesmo padrão de administração dos grupos tratados. Para os animais do grupo A-Ib a dose administrada de ibuprofeno foi de 17,5mg por quilograma de peso corporal do animal uma vez ao dia (KAUR et al, 2011).

Coleta e processamento do material

Aos 81 dias de idade, os animais foram pesados e eutanasiados com tiopental (120 mg/kg) (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA) via intraperitoneal. Os rins foram coletados, lavados, pesados e fixados em formol tamponado 10% por 24 horas. Posteriormente, os rins foram seccionados longitudinalmente e destinados à rotina histológica.

Análises histológicas

Lâminas com secções das amostras de 3µm de espessura foram confeccionadas e destinadas às técnicas histoquímicas de PAS (395B, Sigma-Aldrich), para a análise da densidade glomerular e dos componentes glomerulares; de Tricrômico de Masson (HT15, Sigma-Aldrich), para a análise da fibrose renal; e de HE, para a análise histopatológica.

Para a realização de todas as análises, foram utilizadas fotomicrográficas capturadas no microscópio Nikon Elipse E200-LED com câmera Nikon Digital DXM 1200, no Laboratório de Investigação do Câncer e Inflamação – LAICI do DMOR-UFRN e software ImageJ (US National Institutes of Health), como descrito a seguir.

Densidade Glomerular

O número de perfis glomerulares/área foi quantificado em 20 imagens obtidas com objetiva de 10x por animal (área total analisada foi de 16,53 mm²) (LIMA et al., 2023).

Análises dos componentes glomerulares

Foram analisados 20 glomérulos por animal em imagens obtidas com objetiva de 40x. A área glomerular, do tufo glomerular, espaço urinário, mesangial (µm2), espessura da cápsula glomerular (µm) e a expansão mesangial (%) (área mesangial/área do tufo glomerular x 100) (LIMA et al., 2012).

Análise da fibrose renal

Foram analisados 20 campos microscópicos por animal em imagens obtidas com objetiva de 40x (área total analisada por rato = 1,0331 mm2). As imagens foram capturadas na região cortical do rim, sendo visualizado pelo menos um glomérulo em todos os campos (SCHNEIDER et al., 2012; YAO et al., 2015; MISE et al., 2017; CROTTY ALEXANDER et al, 2018; SHEN et al., 2019).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Kruskal-Wallis pelo software GraphPad Prism 11. A avaliação de correlação entre as variáveis foi analisada pelo teste de Sperman. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

Resultados e Discussões

Os resultados foram agrupados em: parâmetros antropométricos e morfologia glomerular.

Parâmetros antropométricos

Os resultados referentes aos achados antropométricos peso corporal e renal (g) está apresentados da Figura 1.

Não foram identificadas diferenças estatísticas no peso corporal dos animais deste estudo ($p>0,05$). Porém, quanto ao peso renal, observou-se aumento deste parâmetro nos animais do grupo A-Ib de 7,2% e de 8,5% em comparação aos animais dos grupos A e RT-D9, respectivamente ($p<0,05$).

Houve correlação positiva entre o peso corporal e o peso renal nos animais dos grupos C ($r=0,566$; $p=0,0093$), RT-D9 ($r=0.96$, $p<0,0001$) e A-Ib ($r=0,542$, $p=0,013$).

Morfologia glomerular

Os resultados da densidade glomerular e da área glomerular estão apresentados na Figura 2.

A densidade glomerular aumentou em todos os grupos artríticos em comparação ao grupo controle, sendo que, na comparação direta entre os animais artríticos sem tratamento e os saudáveis (grupo C), o número de perfis glomerulares/mm2 foi 35,5% maior no grupo no

grupo A (p<0,0001). Não foram identificadas diferenças neste parâmetro entre os grupos artríticos (p>0,05).

A área glomerular foi menor em todos os grupos artríticos em comparação ao grupo controle, sendo que, na comparação direta entre os animais artríticos sem tratamento e os saudáveis, verificou-se redução de 9,35% no grupo A (p>0,0001). Não foram identificadas diferenças da área glomerular entre os grupos artríticos (p>0,05).

Foi identificada correlação positiva entre a densidade glomerular e a área glomerular no grupo A (p <0,0001) e correlação negativa no grupo A-Ib (p <0,0001).

Os resultados referentes as demais mensurações dos componentes glomerulares estão apresentados na Figura 3.

A espessura da cápsula glomerular foi 15,89% maior nos animais do grupo A e comparação a C (p<0,001). Nas comparações entre os grupos artríticos sem tratamento (A) e com os tratados, foi observado que a espessura da cápsula glomerular foi maior no grupo RT-D9 (33,0%, p<0,0001) e semelhante no grupo A-Ib (p>0,05) (Figura 3-A).

A área do tufo glomerular foi 16,32% menor no grupo A em relação ao C (p<0,0001). Nas comparações entre os grupos artríticos, foi observado o grupo RT-D9 foi o que apresentou maior área do tufo glomerular, sendo 10,1% maior que a do grupo A, porém assim como ocorreu com o grupo A-Ib, as diferenças não foram significativas (p>0,05) (Figura 3-B).

Na análise do espaço urinário foi observado aumento de 25,74% no grupo A em comparação ao grupo C (p<0,05). Na comparação entre os grupos artríticos, nos grupos RT-D9 e A-Ib o espaço urinário foi 18,97% (p<0,05) e 31,81% (p<0,001) menor que no grupo A, respectivamente (Figura 3-C).

A área mesangial foi 33,33% menor no grupo A comparado com o C (p<0,0001). Quando analisados os grupos artríticos, foi observado aumento significativo da área mesangial nos grupos RT-D9 (91,8%) e A-Ib (51,5%) (p<0,0001). RT-D9 foi ainda 26,6% maior que A-Ib (p<0,0001) (Figura 3-D).

Discussão

Os resultados demonstraram que a artrite experimental esteve associada a alterações significativas na morfologia glomerular, principalmente no que se refere ao aumento da densidade glomerular e à redução da área glomerular dos grupos artríticos em relação ao grupo controle. Esses valores são relevantes por evidenciarem o processo inflamatório sistêmico decorrido da indução da artrite, bem como as alterações estruturais decorridas desse processo.

Sobre a densidade glomerular, no grupo A ela foi 35,5% maior e a área glomerular 9,35% menor em relação ao grupo controle. Além disso, a maior espessura da cápsula glomerular e o aumento do espaço urinário no grupo A reforçam a presença de alterações estruturais nos glomérulos dos animais artríticos. Esses achados sugerem que a artrite experimental não se restringiu às manifestações articulares, apresentando também repercussões sobre a morfologia renal. A redução da área dotufo glomerular e da área mesangial no grupo A

em comparação ao controle também evidencia modificações na organização interna do glomérulo.

Em relação aos tratamentos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos artríticos quanto à densidade e à área glomerular, indicando que RT-D9 e ibuprofeno não reverteram significativamente as alterações geradas pela indução à artrite. Entretanto, em comparação ao grupo A, o espaço urinário foi menor nos grupos tratados com RT-D9 e ibuprofeno, enquanto a área mesangial apresentou aumento significativo nesses dois grupos. No grupo RT-D9, também foi observado um aumento significativo da espessura da cápsula glomerular, inclusive em relação ao controle. Esses resultados indicam que os tratamentos produziram modificações pontuais na morfologia glomerular, mas não foram suficientes para restabelecer globalmente o padrão observado nos animais controle.

Quanto aos parâmetros antropométricos, não foram observadas diferenças no peso corporal entre os grupos, indicando que as alterações morfológicas renais identificadas não influenciaram esse parâmetro. Em contrapartida, o aumento do peso renal observado no grupo A-Ib em relação aos grupos A e RT-D9 pode estar relacionado às modificações morfológicas observadas neste grupo.

Em conjunto, os resultados demonstram que a indução da artrite experimental esteve associada a alterações significativas na morfologia glomerular, evidenciadas por modificações na densidade, na área e em diferentes compartimentos do glomérulo. Os tratamentos com RT-D9 e ibuprofeno promoveram modificações em alguns desses parâmetros, especialmente no espaço urinário e na área mesangial. No entanto, não foram capazes de restaurá-los aos valores observados no grupo controle. Dessa forma, os achados obtidos não corroboram os resultados previamente descritos na literatura, uma vez que, nas condições avaliadas, não foram observados os efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e antiartríticos esperados para o tratamento com Rhus toxicodendron (SANTOS et al., 2007; PATIL et al., 2009a; PATIL et al., 2011).

Conclusão

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica que, além do comprometimento articular, pode apresentar repercussões sistêmicas, tornando relevante a investigação de possíveis alterações em órgãos como os rins. Ademais, tendo em vista o potencial negativo do ibuprofeno quando utilizado a longo prazo, torna-se necessário buscar outras formas de tratamento, como os fitoterápicos. Nesse contexto, este estudo avaliou os efeitos da artrite experimental induzida por Adjuvante Completo de Freund sobre parâmetros antropométricos e morfológicos renais, bem como as alterações associadas aos tratamentos com Rhus toxicodendron e ibuprofeno.

Os resultados demonstraram que a artrite experimental esteve associada a alterações significativas na morfologia glomerular, incluindo aumento da densidade glomerular e da espessura da cápsula, além de redução da área glomerular, da área do tufo e da área mesangial, bem como aumento do espaço urinário em relação aos animais saudáveis. Não foram observadas diferenças no peso corporal entre os grupos, enquanto o grupo tratado

com ibuprofeno apresentou maior peso renal. Entre os grupos artríticos, os tratamentos promoveram alterações em parâmetros específicos da morfologia glomerular. A redução do espaço urinário observada nos grupos tratados com Rhus toxicodendron e ibuprofeno, em relação ao grupo artrítico sem tratamento, e o aumento da área mesangial nos grupos tratados revelam modificações estruturais associadas às intervenções avaliadas.

Desse modo, o estudo evidenciou que a artrite experimental esteve associada a alterações na morfologia e na densidade glomerular, sugerindo a ocorrência de alterações compatíveis com glomeruloesclerose nos animais artríticos. Além disso, não houveram evidências de reversão desses parâmetros pelo tratamento com Rhus toxicodendron. Dessa forma, os achados sugerem que o tratamento fitoterápico utilizado não foi capaz de atenuar os danos renais decorrentes da artrite, podendo ainda ter contribuído para a intensificação dessas alterações. Entretanto, são necessários novos estudos, utilizando diferentes formas de administração e diluições de Rhus toxicodendron, a fim de investigar seu possível efeito antioxidante e sua ação sobre o tecido renal.

Referências

ALETAHA, Daniel et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American Collegeof Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis & Rheumatism, v. 62, n. 9, p. 2569-2581, 2010.

BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact, v.1, n. 4, p. 377-85, 2001.

BOLON, Brad et al. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. BioMed Research International, v. 2011, 2010.

GAMBARO, G.; PERAZELLA, M. A. Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. Journal of internal medicine, v. 253, n. 6, p. 643-652, 2003.

HICKSON, LaTonya J. et al. Development of reduced kidney function in rheumatoid arthritis. American Journal of Kidney Diseases, v. 63, n. 2, p. 206-213, 2014.

KAPOOR, Teja; BATHON, Joan. Renal Manifestations of Rheumatoid Arthritis. Rheumatic Disease Clinics, v. 44, n. 4, p. 571-584, 2018.

KRAUSE, Irit et al. Acute renal failure, associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in healthy children. Pediatric Nephrology, v. 20, n. 9, p. 1295-1298, 2005.

MOTA, Licia Maria Henrique da et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. Revista Brasileira de Reumatologia, 52(2):135-174, 2012.

PATIL, Chandragouda Raosaheb et al. Dual effect of Toxicodendron pubescens on Carrageenan induced paw edema in rats. Homeopathy, v. 98, n. 2, p. 88-91, 2009a.

PATIL, Chandragouda Raosaheb et al. Modulation of arthritis in rats by Toxicodendron pubescens and its homeopathic dilutions. Homeopathy, v. 100, n. 03, p. 131-137, 2011.

SANTOS, A. L. dos et al. In vivo study of the anti-inflammatory effect of Rhus toxicodendron. Homeopathy, v. 96, n. 02, p. 95-101, 2007.

Anexos



Figura 2: A) Média do número de perfis glomerulares/mm2 observados (20 campos microscópicos, objetiva de 10x) dos grupos C, A, RT e A-Ib. B) Média da área glomerular (µm2) dos grupos C, A, RT e A-Ib (100 glomérulos/grupo,objetiva de 40x).Coloração de PAS.



Figura 1: Gráfico da média ± erro padrão do Peso corporal (g) e do Peso renal (g) dos animais dos grupos C, A, RT e A-Ib (n=5, teste de Kruskal-Wallis, *p<0,05).



Figura 3. A) Espessura da cápsula glomerular (µm); B) Área do Tufo glomerular (µm2); C) Área do espaço urinário (µm2) e; D) Área do mesângio (µm2) dos grupos C, A, RT e A-Ib (objetiva de 40x, 100 glomérulos/grupo). Coloração de PAS.

CÓDIGO: SB0914

AUTOR: LEON FREITAS LOPES

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: Estudo da Síndrome de Ehlers-Danlos Hipermóvel: Caracterização Clínica, Análise de Estudos de Caso na Literatura e Contribuições para o Diagnóstico

Resumo

A Síndrome de Ehlers-Danlos (SED) é um grupo de doenças hereditárias do tecido conjuntivo, com 14 subtipos reconhecidos, decorrentes de mutações em genes relacionados à produção e maturação do colágeno. O subtipo hipermóvel (SEDh) é o único ainda sem gene causal identificado, o que dificulta seu diagnóstico e favorece o subdiagnóstico, sobretudo no Brasil, onde faltam dados epidemiológicos e protocolos unificados. Este trabalho teve como objetivo caracterizar clinicamente a SEDh por meio de revisão integrativa da literatura e da coleta de dados clínicos de pacientes participantes do projeto "Análise molecular e nutricional de pacientes com Síndrome de Ehlers-Danlos". Foi aplicada a seção de quadro clínico do instrumento de coleta do projeto principal, com participantes maiores de 18 anos, recrutados via redes sociais e atendimento no IMT-UFRN. Dos 126 participantes analisados, 94,4% eram mulheres, com escore médio de 7,2 na Escala de Beighton e predomínio do subtipo hipermóvel (77,8%). Fadiga crônica, disautonomia, dor articular e sintomas gastrointestinais (96,8% da amostra) foram as manifestações mais prevalentes, além de comorbidades como POTS, TDAH, fibromialgia e endometriose. Os achados reforçam o perfil multissistêmico da SEDh descrito na literatura e evidenciam lacunas assistenciais, contribuindo para o reconhecimento clínico da síndrome no contexto brasileiro.

Palavras-chave: Ehlers-Danlos. Hipermobilidade. Diagnóstico. Comorbidades.

TITLE: Study of Hypermobile Ehlers-Danlos Syndrome: Clinical Characterization, Analysis of Case Studies in the Literature and Contributions to Diagnosis

Abstract

Ehlers-Danlos syndrome (EDS) is a group of hereditary connective tissue disorders comprising 14 recognized subtypes, resulting from mutations in genes involved in collagen production and maturation. The hypermobile subtype (hEDS) is the only one without an identified causal gene, which hampers diagnosis and contributes to underdiagnosis, particularly in Brazil, where epidemiological data and unified protocols are lacking. This study aimed to clinically characterize hEDS through an integrative literature review and the collection of clinical data from patients participating in the project "Molecular and nutritional analysis of patients with Ehlers-Danlos syndrome". The clinical profile section of the main project's data collection instrument was applied to participants aged over 18, recruited through social media and in-person visits at IMT-UFRN. Among 126 participants analyzed, 94.4% were women, with a mean Beighton score of 7.2 and predominance of the hypermobile subtype (77.8%). Chronic fatigue, dysautonomia, joint pain and gastrointestinal symptoms (96.8% of the sample) were the most prevalent manifestations, alongside comorbidities such as POTS, ADHD, fibromyalgia and endometriosis. These findings reinforce the multisystemic profile of hEDS described in the literature and highlight gaps in care, contributing to the clinical recognition of the syndrome in the Brazilian context.

Keywords: Ehlers-Danlos. Hypermobility. Diagnosis. Comorbidities.

Introdução

O tecido conjuntivo exerce um papel fundamental na estrutura e função de diversos sistemas orgânicos. A Síndrome de Ehlers-Danlos (SED) é uma condição genética hereditária caracterizada por um grupo diversificado de distúrbios do tecido conjuntivo, com 14 subtipos reconhecidos, resultantes de mutações em ao menos 20 genes envolvidos na produção e maturação do colágeno (BLACKBURN et al., 2018). Suas principais características incluem frouxidão ligamentar, hiperextensibilidade da pele e hipermobilidade articular (MILLER; GROSEL, 2020). Apesar de a Síndrome de Ehlers-Danlos hipermóvel (SEDh) ser definida pela hipermobilidade articular, dor crônica e fadiga são as queixas mais prevalentes e debilitantes; o medo de exacerbar dor ou instabilidade leva a crenças errôneas sobre atividade física e à redução da capacidade funcional (SIMMONDS et al., 2019).

Ademais, disfunções gastrointestinais como obstipação, retardo do esvaziamento gástrico e desconforto abdominal são frequentes (DO et al., 2021). Comorbidades como Síndrome de Ativação Mastocitária, disautonomia, Síndrome da Taquicardia Postural Ortostática, endometriose, ansiedade e transtorno do espectro autista também são comuns (GENSEMER et al., 2021), assim como transtornos de humor e ansiedade, cuja investigação é fundamental para diagnóstico precoce e tratamento eficaz (KENNEDY et al., 2022). Recomenda-se abordagem multidimensional para o manejo desse "fenótipo neuroconectivo", que envolve disfunção autonômica e alterações proprioceptivas (BULBENA et al., 2017).

Desde a classificação de 2017 pelo Consórcio Internacional da SED, com posterior inclusão de um 14º subtipo (BLACKBURN et al., 2018; MALFAIT et al., 2020), a SEDh permanece o único subtipo sem gene causal identificado, o que dificulta diagnóstico, compreensão fenotípica e desenvolvimento terapêutico. A raridade e o subdiagnóstico resultam em dados epidemiológicos imprecisos (MALFAIT et al., 2020), cenário agravado no Brasil pela ausência de dados de prevalência e de protocolo unificado do Ministério da Saúde. Diante disso, este trabalho, embasado em revisão integrativa e estudo de série de casos, busca responder: qual o perfil clínico, o espectro de comorbidades e os desafios de manejo da SEDh em pacientes diagnosticados? Teve-se como objetivo geral realizar caracterização clínica detalhada da SEDh por meio de revisão da literatura, análise de estudos de caso e coleta de dados clínicos de pacientes com SED.

Metodologia

A metodologia consistiu em abordagem mista, combinando revisão de literatura e coleta de dados clínicos primários.

Realizou-se revisão integrativa da literatura para caracterizar o quadro clínico da SEDh, com buscas nas bases PubMed, LILACS, SciELO e Google Scholar, utilizando descritores controlados e não controlados em português e inglês ("Síndrome de Ehlers-Danlos hipermóvel", "hypermobile Ehlers-Danlos syndrome", "hEDS"), combinados a termos como "manifestações clínicas", "comorbidades", "diagnóstico". Os estudos selecionados (diretrizes, revisões, estudos observacionais, relatos de caso) foram analisados para extração de etiologia, fisiopatologia, quadro clínico, critérios diagnósticos (classificação de 2017) e principais comorbidades, além do mapeamento específico de estudos de caso e séries de casos para contextualização dos dados primários.

O estudo de campo constituiu-se em série de casos com abordagem multimodal, desenvolvida em colaboração com o projeto "Análise molecular e nutricional de pacientes com Síndrome de Ehlers-Danlos". A amostra foi composta por indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e/ou genético prévio de SED, recrutados por divulgação em redes sociais (Instagram @ehlersdanlos.ufrn), conforme critérios de inclusão e exclusão do projeto principal.

A coleta de dados primários limitou-se à aplicação da seção de "questionamento sobre o quadro clínico" do protocolo do projeto principal, por meio de questionário estruturado sobre histórico médico pregresso e familiar, queixas atuais, sintomas e comorbidades associadas à SEDh, aplicado de forma presencial (IMT-UFRN) e virtual (formulário eletrônico). Foram registrados dados sociodemográficos, tipo e ano de diagnóstico, especialidade responsável, subtipo, achados genéticos quando disponíveis, pontuação na Escala de Beighton, sintomas musculoesqueléticos e sistêmicos, comorbidades e sintomas gastrointestinais.

O estudo seguiu as normas éticas vigentes, com esclarecimento prévio dos objetivos e obtenção obrigatória do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no âmbito da aprovação do projeto principal pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN.

Para a análise dos dados, dois participantes com idade inferior a 18 anos identificados na base de coleta foram excluídos da amostra quantitativa, por não atenderem ao critério de inclusão etário, restando amostra final de 126 participantes adultos. As informações da revisão integrativa, dos estudos de caso mapeados e da coleta primária foram organizadas e processadas com abordagem qualitativa e descritiva, priorizando a identificação da prevalência dos principais achados clínicos e comorbidades e o mapeamento de padrões fenotípicos da SEDh no contexto brasileiro, com estabelecimento de correlações entre achados primários e literatura científica.

Resultados e Discussões

A amostra analisada foi composta por 126 participantes maiores de 18 anos, respeitando o critério de inclusão etário adotado neste trabalho. Dois participantes menores de 18 anos identificados na base de dados bruta (1 e 9 anos) foram excluídos da análise quantitativa; ambos permanecem vinculados ao projeto principal, mas não integram nenhum percentual ou média..

Em relação ao perfil demográfico, do total de 126 participantes, 119 (94,4%) se identificaram como mulheres cisgênero, 2 (1,6%) como homens cisgênero, 1 (0,8%) como homem transgênero e 1 (0,8%) como não binário; 3 (2,4%) não informaram o gênero. Esse predomínio expressivo do sexo feminino é compatível com o descrito na literatura para a SEDh. A idade foi calculada a partir da data de nascimento, disponível para 118 dos 126 participantes, com média de 38,9 anos (mediana de 39,5 anos) e amplitude de 19 a 60 anos, concentrando-se principalmente nas faixas de 30 a 49 anos (69,5% da amostra com idade conhecida).

No tocante à caracterização do diagnóstico, quanto à modalidade de coleta, 121 participantes (96,0%) responderam ao formulário on-line e 5 (4,0%) foram avaliados presencialmente no IMT-UFRN; todos assinaram o TCLE, e a coleta de sangue ocorreu em apenas 5 casos (4,0%), correspondentes aos atendimentos presenciais. Em relação ao tipo de diagnóstico, 103 participantes (81,7%) possuíam apenas diagnóstico clínico, 20 (15,9%) diagnóstico clínico associado a confirmação genética, 1 (0,8%) apenas diagnóstico genético e 2 (1,6%) não informaram esse dado. Esse predomínio do diagnóstico exclusivamente clínico já era esperado, uma vez que a SEDh - subtipo mais frequente na amostra - ainda não possui gene causal identificado, permanecendo seu diagnóstico fundamentado nos critérios clínicos internacionais de 2017 (MALFAIT et al., 2020). As especialidades mais frequentemente responsáveis pelo diagnóstico foram Genética Médica (47 casos) e Reumatologia (25 casos), seguidas por Fisiatria, Neurologia, Cardiologia, Ortopedia e Dermatologia, em menor proporção.

Quanto aos subtipos, houve predomínio acentuado do subtipo hipermóvel (98 casos; 77,8%), seguido do subtipo clássico (10 casos; 7,9%), vascular (4 casos; 3,2%) e demais subtipos, incluindo musculocontractural e periodontal (2 casos; 1,6%); em 12 casos (9,5%) o subtipo não foi identificado ou informado. O predomínio do subtipo hipermóvel está de acordo com a epidemiologia geral da SED (MALFAIT et al., 2020) e justifica o recorte proposto neste trabalho. O subtipo vascular, embora minoritário, merece atenção clínica diferenciada por seu maior risco de complicações vasculares e viscerais graves.

Registros de gene causal (destacando-se variantes em COL5A1, COL3A1 e COL1A2) estavam disponíveis para apenas 9 participantes, compatíveis majoritariamente comos subtipos clássico e vascular, reforçando a lacuna de confirmação molecular já discutida por Blackburn et al. (2018) para os subtipos com etiologia genética estabelecida.

A pontuação na Escala de Beighton, instrumento validado para avaliação da hipermobilidade articular generalizada (escore de 0 a 9), foi registrada para 124 dos 126 participantes (98,4%). A média observada foi de 7,2 pontos (mediana de 7,0), com amplitude entre 2 e 9 pontos. Do total avaliado, 114 participantes (91,9%) apresentaram escore igual ou superior a 5, ponto de corte adotado para caracterização de hipermobilidade articular generalizada em adultos, confirmando um perfil de hipermobilidade acentuada, consistente com o predomínio do subtipo hipermóvel na amostra e com os critérios diagnósticos vigentes.

A partir da análise dos campos de relato livre de sintomas (120 participantes com resposta preenchida), as manifestações mais frequentemente relatadas foram fadiga crônica (55 casos; 45,8%), disautonomia/taquicardia (45 casos; 37,5%), dor articular crônica (37 casos; 30,8%), luxações/subluxações articulares (22 casos; 18,3%), cicatrização anormal (19 casos; 15,8%), hematomas com facilidade (18 casos; 15,0%), relato espontâneo de hipermobilidade articular (13 casos; 10,8%), pele hiperextensível/fina/aveludada (10 casos; 8,3%), escoliose/cifose (8 casos; 6,7%) e estrias atróficas (5 casos; 4,2%). Chama atenção que fadiga crônica e disautonomia/taquicardia foram as manifestações mais prevalentes, superando inclusive o relato espontâneo de hipermobilidade articular — achado que reforça a observação de Simmonds et al. (2019) de que a dor crônica e a fadiga, e não a hipermobilidade em si, constituem as queixas mais debilitantes referidas pelos pacientes com SEDh, com repercussões diretas sobre crenças e comportamentos relacionados à atividade física.

As comorbidades mais frequentemente relatadas foram disautonomia/POTS (40 casos; 33,3%), Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade — TDAH (24 casos; 20,0%), fibromialgia (22 casos; 18,3%), endometriose (21 casos; 17,5%), Síndrome de Ativação Mastocitária — SAM (16 casos; 13,3%), rinite/asma/alergias (13 casos; 10,8%), depressão (12 casos; 10,0%), ansiedade (9 casos; 7,5%), hipotireoidismo (7 casos; 5,8%), enxaqueca/cefaleia crônica (6 casos; 5,0%) e prolapso valvular (2 casos; 1,6%). A elevada prevalência de disautonomia/POTS e de SAM corrobora a literatura sobre a chamada "tríade de sobreposição" entre SEDh, distúrbios disautonômicos e mastocitose (GENSEMER et al., 2021; DO et al., 2021). A frequência relevante de TDAH, depressão e ansiedade reforça a necessidade de investigação da saúde mental como parte do manejo multidisciplinar da SEDh, conforme apontado por Kennedy et al. (2022) e Bulbena et al. (2017), que descrevem a SED como um "fenótipo neuroconectivo" que exige abordagem integrada entre disfunção autonômica, propriocepção e saúde mental.

Sintomas gastrointestinais foram relatados por 122 dos 126 participantes (96,8%), evidenciando a relevância desse eixo clínico na população estudada. Os sintomas mais relatados foram refluxo/azia (41 casos; 33,6%), constipação intestinal (40 casos; 32,8%), distensão abdominal/estufamento (26 casos; 21,3%), diarreia/intestino solto (23 casos; 18,9%), náuseas/vômitos (16 casos; 13,1%), flatulência/gases excessivos (14 casos; 11,5%), gastrite (13 casos; 10,7%), intolerância alimentar a lactose/glúten (13 casos; 10,7%) e Síndrome do Intestino Irritável, quando referida como diagnóstico prévio (8 casos; 6,6%). Refluxo/azia e constipação intestinal foram as queixas mais prevalentes,

com frequências muito próximas entre si. Esse achado é consistente com o descrito por Do et al. (2021) sobre a alta prevalência de disfunções do trânsito gastrointestinal — incluindo obstipação, retardo do esvaziamento gástrico e alterações de motilidade — em pacientes com síndromes de hipermobilidade e disautonomia. Notou-se ainda que parte relevante dos participantes com sintomas gastrointestinais relatou não realizar nenhum acompanhamento especializado voltado a esses sintomas, sinalizando uma lacuna assistencial que reforça a pertinência da abordagem nutricional do projeto principal ao qual este trabalho está vinculado.

Dessa forma, os achados desta série de casos convergem com o perfil multissistêmico da SEDh descrito na literatura internacional: predomínio de mulheres jovens e de meia-idade, hipermobilidade articular generalizada acentuada, diagnóstico majoritariamente clínico e ampla sobreposição com quadros disautonômicos, mastocitários, psiquiátricos e ginecológicos (GENSEMER et al., 2021; KENNEDY et al., 2022; BULBENA et al., 2017). A elevadíssima prevalência de sintomas gastrointestinais, ainda pouco acompanhados clinicamente, reforça a lacuna assistencial já apontada por Do et al. (2021) e evidencia a relevância de projetos com enfoque nutricional voltados a essa população. A escassez de dados epidemiológicos brasileiros sobre a SED (MALFAIT et al., 2020) confere a este trabalho relevância adicional, ao fornecer uma caracterização clínica sistematizada de uma amostra nacional relativamente ampla (N = 126), contribuindo para o reconhecimento precoce da síndrome e para o direcionamento do cuidado multidisciplinar no contexto do Sistema Único de Saúde.

Conclusão

A caracterização clínica da amostra estudada evidenciou um perfil consistente com o descrito na literatura internacional sobre a Síndrome de Ehlers-Danlos hipermóvel: predomínio expressivo do sexo feminino, hipermobilidade articular generalizada acentuada (escore médio de 7,2 na Escala de Beighton) e diagnóstico majoritariamente clínico, refletindo a ausência de gene causal identificado para esse subtipo. A elevada prevalência de fadiga crônica e disautonomia, superior inclusive ao relato espontâneo de hipermobilidade, reforça que a dor crônica e a fadiga — e não a hipermobilidade isolada — constituem as queixas mais debilitantes da síndrome, corroborando achados prévios da literatura.

A presença quase universal de sintomas gastrointestinais, associada a uma parcela relevante de pacientes sem acompanhamento especializado voltado a esses sintomas, aponta uma lacuna assistencial importante e reforça a pertinência da abordagem nutricional adotada pelo projeto principal. Da mesma forma, a alta frequência de comorbidades como disautonomia/POTS, Síndrome de Ativação Mastocitária, TDAH, fibromialgia e endometriose confirma o caráter multissistêmico da SEDh e a necessidade de manejo multidisciplinar.

Conclui-se, portanto, que este trabalho contribui para o reconhecimento clínico da SEDh no contexto brasileiro, ainda carente de dados epidemiológicos e protocolos assistenciais unificados, fornecendo subsídios descritivos que podem orientar a suspeita diagnóstica precoce e o direcionamento do cuidado multiprofissional. Como recomendação para

pesquisas futuras, sugere-se a ampliação da confirmação genética da amostra e o aprofundamento da investigação sobre o eixo gastrointestinal.

Referências

BLACKBURN, P. R. et al. Bi-allelic Alterations in AEBP1 Lead to Defective Collagen Assembly and Connective Tissue Structure Resulting in a Variant of Ehlers-Danlos Syndrome. American Journal of Human Genetics, v. 102, n. 4, 2018. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5985336/. Acesso em: 24 out. 2025.

BULBENA, A. et al. Psychiatric and psychological aspects in the Ehlers-Danlos syndromes. American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics), v. 175C, n. 1, p. 237-245, 2017. Disponível em:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.c.31544. Acesso em: 26 nov. 2025.

DO, T. et al. Nutritional Implications of Patients with Dysautonomia and Hypermobility Syndromes. Current Nutrition Reports, 2021. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8435108/. Acesso em: 24 out. 2025.

GENSEMER, C. et al. Hypermobile Ehlers-Danlos syndromes: Complex phenotypes, challenging diagnoses, and poorly understood causes. Developmental Dynamics, John Wiley and Sons Inc., 1 mar. 2021. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7785693/. Acesso em: 24 out. 2025.

KENNEDY, M. et al. The psychological burden associated with Ehlers-Danlos syndromes: a systematic review. J Osteopath Med, v. 122, n. 8, p. 381-392, 2022. Disponível em:https://doi.org/10.1515/jom-2021-0267. Acesso em: 28 nov. 2025.

MALFAIT, F. et al. The Ehlers-Danlos syndromes. Nature Reviews Disease Primers, v. 6, n. 1, 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41572-020-0194-9. Acesso em: 25 out. 2025.

MILLER, E.; GROSEL, J. M. A review of Ehlers-Danlos syndrome. Journal of the American Academy of Physician Assistants, 2020. Disponível em: https://journals.lww.com/jaapa/fulltext/2020/04000/a_review_of_ehlers_danlos_syndrome.3.aspx. Acesso em: 26 out. 2025.

SIMMONDS, J. V. et al. Exercise beliefs and behaviours of individuals with Joint Hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome - hypermobility type. Disability and Rehabilitation, v. 41, n. 4, p. 445-455, 2019. Disponível em:https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09638288.2017.1417081. Acesso em: 28 nov. 2025.

CÓDIGO: SB0940

AUTOR: GABRIELLY ALVES DO NASCIMENTO

COAUTOR: MARCIA VITORIA FERNANDES FERREIRA

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Morfometria linear aplicada ao estudo do dimorfismo sexual em Ptecticus testaceus (Fabricius, 1794) (Diptera: Stratiomyidae)

Resumo

A variação morfológica em Stratiomyidae tem se limitado a descrições qualitativas. Este estudo objetivou quantificar o dimorfismo sexual somático e alar na mosca-soldado *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1794) via morfometria linear multivariada. Adultos foram obtidos de frutos de *Mangifera indica* L. no Parque Estadual Dunas de Natal (RN). Foram mensuradas 16 variáveis (cabeça, tórax, asas e pernas), com precisão validada por repetibilidade (R > 0,998). A desvinculação entre tamanho e forma foi avaliada por Teste t, MANCOVA, regressões SMA, Coeficiente RV, PCA e DFA. A diferenciação fenotípica é regida pelo tamanho corporal absoluto, sendo os machos maiores que as fêmeas, um padrão atípico em dípteros possivelmente ligado à competição intrassexual. O dimorfismo de forma restringiu-se ao comprimento torácico e segmentos proximais das pernas posteriores (fêmur e tíbia). As estruturas cefálicas e alares mantiveram isometria, indicando canalização desenvolvimental. De forma inédita, identificou-se integração fenotípica sexualmente dimórfica: fêmeas apresentaram modularidade entre os compartimentos cefálico e locomotor, enquanto machos exibiram integração estrita. A análise da forma pura ratificou o conservadorismo da espécie (ampla sobreposição na PCA e acurácia de 60,0% na DFA). Conclui-se que o dimorfismo em *P. testaceus* é um fenômeno de escala corporal absoluta com remodelações no aparato translocatório, estabelecendo a primeira caracterização quantitativa para Sarginae.

Palavras-chave: Mosca-soldado. Asas. Diferenciação fenotípica.

TITLE: Linear morphometry applied to the study of sexual dimorphism in Ptecticus testaceus (Fabricius, 1794) (Diptera: Stratiomyidae)

Abstract

Morphological variation in Stratiomyidae has been limited to qualitative descriptions. This study aimed to quantify somatic and wing sexual dimorphism in the soldier fly *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1794) via multivariate linear morphometrics. Adults were obtained from *Mangifera indica* L. fruits at Dunas de Natal State Park (RN). Sixteen variables (head, thorax, wings, and legs) were measured, with precision validated by repeatability ($R > 0.998$). The uncoupling between size and shape was evaluated by t-test, MANCOVA, SMA regressions, RV Coefficient, PCA, and DFA. Phenotypic differentiation is driven by absolute body size, with males being larger than females, an atypical pattern in dipterans possibly linked to intrasexual competition. Shape dimorphism was restricted to thoracic length and proximal segments of the hind legs (femur and tibia). Cephalic and wing structures maintained isometry, indicating developmental canalization. Unprecedentedly, sexually dimorphic phenotypic integration was identified: females showed modularity between cephalic and locomotor compartments, while males exhibited strict integration. Pure shape analysis confirmed the species' conservatism (broad overlap in PCA and 60.0% accuracy in DFA). It is concluded that dimorphism in *P. testaceus* is an absolute body scale phenomenon with translocatory apparatus remodeling, establishing the first quantitative characterization for Sarginae.

Keywords: Soldier fly. Wings. Phenotypic differentiation.

Introdução

Os insetos abrigam a maior fração da biodiversidade do planeta, sendo os dípteros (ordem Diptera) responsáveis por cerca de 15% dessa riqueza conhecida (Stork, 2018). Dentre os dípteros braquíceros inferiores, a família Stratiomyidae (moscas-soldado) reúne táxons de extraordinária relevância funcional (Woodley, 2001). Suas larvas atuam preponderantemente na saprofagia de matéria orgânica vegetal e animal em decomposição e detritos foliares úmidos, desempenhando papel indispensável na aceleração da ciclagem de nutrientes minerais, na aeração pedológica e na manutenção da fertilidade do solo (Brown et al., 2018; Courtney et al., 2017). Na subfamília Sarginae, destaca-se *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1794), cujas populações habitam estratos florestais neotropicais associadas à matéria vegetal em fermentação.

O dimorfismo sexual constitui a expressão fenotípica de divergências entre machos e fêmeas, moldadas por pressões seletivas assimétricas que governam reprodução e sobrevivência (Fairbairn, 1997). Em dípteros, tais divergências abrangem o dimorfismo sexual de tamanho (*Sexual Size Dimorphism*, SSD), comumente favorável às fêmeas pela seleção por fecundidade (*fecundity selection*), e o dimorfismo de forma (*Sexual Shape Dimorphism*, SShD), que remodela apêndices locomotores e receptores sensoriais sob seleção intrasexual e intersexual (Blanckenhorn et al., 2007; Stillwell; Fox, 2007).

Contudo, a caracterização morfológica tradicional em Stratiomyidae tem se fundamentado preponderantemente em descrições qualitativas ou inspeções visuais subjetivas, restritas a peças genitais masculinas e terminações abdominais (Woodley, 2001). Essa dependência descritiva mascara a complexidade de variações alométricas contínuas e padrões sutis de remodelamento corporal, inviabilizando a segregação precisa entre efeitos de escala isométrica e modificações adaptativas reais (Bookstein,

1991; Klingenberg, 2016). Torna-se indispensável a aplicação de métodos morfométricos rigorosos para decodificar essa arquitetura. A morfometria linear clássica quantifica dimensões corporais e alares, permitindo avaliar a partição de biomassa relativa sob testes multivariados (Knell; Moczek, 2017).

O estudo justifica-se pela urgente necessidade de superar lacunas sobre padrões de variação microevolutiva em dípteros neotropicais saprófagos. Enquanto famílias fitófagas de impacto agrícola, como Tephritidae, possuem morfologia amplamente mapeada (Malavasi; Zucchi, 2000; Araújo; Fernandes, 2023), táxons saprófagos vitais para o equilíbrio ecológico permanecem negligenciados sob a ótica morfométrica quantitativa.

Este trabalho avalia e quantifica o dimorfismo sexual somático e alar em *P. testaceus* por meio da integração de dimensões corporais e lineares alares. A caracterização fenotípica entre machos e fêmeas fundamenta-se na mensuração de 15 variáveis corporais e no isolamento de divergências estruturais independentes do tamanho por meio de Análise Multivariada de Covariância (MANCOVA), estabelecendo os padrões de partição alométrica da biomassa na espécie.

Metodologia

LOCAL DE AMOSTRAGEM

A pesquisa foi realizada no Parque Estadual Dunas de Natal “Jornalista Luiz Maria Alves”, Natal, RN, de 01/05 a 13/07/2025. A área integra a ZPA-02, incluindo o ecossistema do parque e o tabuleiro litorâneo adjacente, sendo unidade de conservação destinada à proteção ambiental e atividades científicas.

MÉTODO DE COLETA

Foram coletados manualmente frutos caídos de *Mangifera indica* L., priorizando frutos maduros, infestados ou em decomposição. O sítio foi georreferenciado com smartphone e Timestamp Camera, registrando coordenadas e altitude (-5.8126, -35.1941; 47). Os frutos foram acondicionados em sacolas plásticas e transportados ao laboratório.

OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS ADULTOS

Após triagem e pesagem (balança analógica, 1 kg), os frutos foram acondicionados em recipientes com vermiculita hidratada, conforme metodologia adaptada de Nascimento et al. (2000), e vedados com voil. Cada unidade recebeu identificação de localidade, data, hospedeiro e triagem. A vermiculita foi peneirada semanalmente por três semanas; pupários foram transferidos para recipientes em gaiolas de acrílico. A emergência foi monitorada até sete dias após a terceira triagem e os adultos preservados em álcool etílico 70%. Após o ciclo, frutos e resíduos foram descartados e a vermiculita esterilizada em autoclave a 120 °C, 1 ATM, por 15–20 min.

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A identificação baseou-se na descrição original e em caracteres diagnósticos da literatura (Fabricius, 1794; James; Mcfadden, 1982). *P. testaceus* foi reconhecida pela coloração amarelo-testácea, mesonoto unicolor, abdome com faixas transversais escuras, fêmur posterior amarelo sem anelações, tíbia castanho-amarelada e basitarso posterior predominantemente escuro, contrastando com os demais tarsômeros paleáceos.

ACONDICIONAMENTO, RASTREABILIDADE E SEXAGEM

Os espécimes foram armazenados individualmente em microtubos Eppendorf com álcool 70% e codificados por procedência, hospedeiro, família, frasco, espécie, triagem, sexo, registro fotográfico e réplica de medição. A sexagem, sob estereomicroscópio, baseou-se nas terminações abdominais: fêmeas com oviscapo afilado e placas cerígeras; machos com epândrio mais robusto e clásperes (Figura 1).

VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS

Para quantificar o dimorfismo sexual somático e alar, extraíram-se 16 medidas lineares bidimensionais a partir de imagens digitais calibradas, cujos eixos, delimitações e barras de escala (1 mm) estão ilustrados na Figura 2, utilizadas pelo software para converter pixels em unidades reais. As variáveis analisadas foram: cabeça (CL, CD, IO, OL, OC, FlL, FlC), tórax (TC, IA), perna posterior direita (FC, TiC, BC, T1C, T2C) e asa (AC, AL).

DISSECAÇÃO E PREPARAÇÃO

A asa e a perna posterior direitas foram excisadas e montadas temporariamente em lâminas com glicerina para fotografia; depois, foram lavadas com álcool 70% e armazenadas. Os remanescentes corporais foram desidratados a 40 °C por 72 h e montados em triângulos de papel cartão, com cola branca, alfinete Tecnident nº 2 e etiquetas de identificação.

CAPTURA E CALIBRAÇÃO

As imagens foram obtidas em estereomicroscópio Motic SMZ-168 com câmera Moticam 5+, utilizando lâmina micrométrica e Motic Images Plus 2.0 ML. Barra de escala: 1 mm. O hábito geral foi fotografado a 0,75×; asas, pernas e tórax a 1×; e cabeça a 2×.

OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS DADOS

As medidas foram extraídas no MorphoJ 1.08.02 após calibração pela escala de 1 mm. As imagens foram rotacionadas quando necessário para garantir medições lineares. Os dados foram organizados no Google Planilhas com código, sexo e variáveis..

MORFOMETRIA LINEAR E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação do dimorfismo sexual e dos padrões alométricos em *P. testaceus* foi realizada por meio de análises estatísticas descritivas, testes de comparação, análises de

covariância e métodos multivariados. Também foram avaliadas a repetibilidade das medidas, as relações alométricas e a integração entre as características morfológicas. Todas as análises adotaram nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Repetibilidade e descrição

O erro e a repetibilidade foram estimados pelas quatro réplicas de cada espécime, usando ANOVA unidirecional para separar variância entre indivíduos e erro intraindividual. Após validação, calculou-se a média por indivíduo e aplicou-se Log10. Foram obtidos média, desvio padrão, mínimo, máximo e CV%, por sexo.

Tamanho corporal

A distância interalar (IA) foi usada como *proxy* de tamanho. O dimorfismo absoluto foi testado por teste t de Student com correção de Welch e quantificado pelo SDI e *d* de Cohen.

Forma independente do tamanho

MANCOVA global avaliou diferenças de forma entre sexos, com Log10(IA) como covariável; ANCOVAs univariadas avaliaram cada estrutura. O efeito foi expresso por η^2 parcial e os P-valores ajustados por FDR.

Alometria

Regressões SMA entre Log10 das estruturas e Log10(IA) estimaram as inclinações (*b*) por sexo, com IC95%. A isometria foi testada por H0: $b = 1$ e o paralelismo entre sexos pela interação tamanho × sexo.

Integração e modularidade

Correlações de Pearson e *heatmaps* avaliaram a integração fenotípica em fêmeas, machos e amostra global. A modularidade entre os módulos cefálico (cabeça e apêndices sensoriais) e locomotor (tórax e pernas) foi testada pelo coeficiente RV com 1000 permutações.

PCA

A “forma pura” correspondeu aos resíduos das regressões de cada variável Log10 sobre Log10(IA). Após padronização, os resíduos foram submetidos à PCA para redução da dimensionalidade e visualização dos principais eixos de variação.

DFA

A DFA avaliou a classificação de machos e fêmeas a partir das variáveis residuais, com validação cruzada LOOCV para estimar a acurácia.

Softwares

As análises foram programadas em Python 3.10.16, com SciPy 1.12.0, Statsmodels 0.14.0 e Scikit-learn 1.4.0; gráficos, com Matplotlib 3.6.0 e Seaborn 0.12.2.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

REPETIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA

A aferição da variância intraindividual confirmou a precisão das mensurações lineares. A análise do erro de medição revelou valores residuais baixos, oscilando entre 0,0004% e 0,139% entre as estruturas. Esses resultados asseguram que as diferenças observadas refletem a variação biológica real e independem de imprecisões metodológicas. A matriz completa de variância e repetibilidade pode ser consultada no Apêndice A, demonstrando que os índices de repetibilidade alcançaram valores consistentemente superiores a 0,998 para todas as 16 variáveis.

A estatística descritiva sintetizou a distribuição do tamanho e a variação estrutural entre os sexos, conforme a Tabela 1. A avaliação da distância Interalar (IA) demonstrou que as fêmeas registraram um tamanho corporal médio de 1,81 mm, enquanto os machos apresentaram 1,99 mm. As maiores dispersões de dados, expressas pelo Coeficiente de Variação (CV%), localizaram-se nas estruturas da cápsula cefálica e nos apêndices. A distância Interorbital (IO) exibiu a maior variação nas fêmeas (18,30%), e o comprimento do Flagelômero (FlC) foi a métrica mais variável nos machos (14,14%). O complexo alar apresentou a maior estabilidade morfológica da espécie, com os coeficientes mínimos observados no comprimento da asa (AC) nas fêmeas (5,66%) e na largura da asa (AL) nos machos (5,82%).

DIMORFISMO SEXUAL DE TAMANHO E FORMA

A avaliação global da forma corporal, controlando-se estatisticamente o efeito de escala associado ao tamanho (distância Interalar - IA), confirmou a existência de dimorfismo sexual morfológico significativo em *P. testaceus* (MANCOVA: Wilk's Lambda = 0,683; $F = 3,74$; $p < 0,001$).

Para decodificar quais estruturas comandam esse dimorfismo, os componentes absolutos (tamanho bruto) e relativos (forma) foram testados individualmente, conforme a Tabela 2. A análise de diferenças absolutas (Teste T) revelou que machos são significativamente maiores que as fêmeas na maioria das extensões somáticas, incluindo a cápsula cefálica (CL, CD, OL, OC) e o complexo alar (AC, AL) ($p < 0,05$). O maior distanciamento bruto entre os sexos foi observado no comprimento do Tórax (TC) e nas extremidades locomotoras (FC, TiC), que exibiram um elevado Tamanho de Efeito (d de Cohen > 1,08) e Índice de Dimorfismo Sexual (SDI) próximo a -9,0%.

Contudo, ao isolar o efeito isométrico do tamanho corporal por meio das ANCOVAs univariadas (com correção FDR), constatou-se que a divergência fenotípica na cabeça e nas asas resulta estritamente de uma questão de escala. Ou seja, estruturas cefálicas e

alares são maiores nos machos simplesmente porque os machos são insetos maiores, não havendo diferença de proporção (shape) em relação às fêmeas (P-ajustado FDR > 0,05).

O dimorfismo de forma real (SShD), independente do tamanho do corpo, foi detectado exclusivamente na região torácica e no aparato translocatório proximal da perna posterior. O Tórax (TC; P-FDR = 0,0231), o Fêmur (FC; P-FDR = 0,0020) e a Tíbia (TiC; P-FDR = 0,0016) demonstraram proporções estruturais estatisticamente distintas entre os sexos (Figura 3).

As diferenças brutas e as trajetórias alométricas das demais variáveis morfométricas não apontaram divergência de forma significativa (isometria) e encontram-se detalhadas no Apêndice B.

PADRÕES ALOMÉTRICOS

A investigação da trajetória de crescimento relativo das estruturas em relação ao tamanho corporal geral revelou que a arquitetura morfológica de *P. testaceus* é predominantemente conservadora e isométrica (Apêndice C). Para a ampla maioria das estruturas somáticas da cápsula cefálica e apêndices (como largura da cabeça, flagelômeros e tarsos), a inclinação das retas de regressão (coeficiente b de SMA) não diferiu estatisticamente de 1 ($p > 0,05$). Isso indica que essas estruturas crescem em proporção exata e constante com o corpo, tanto para fêmeas quanto para machos.

O teste de paralelismo (interação Sexo vs. Log IA) confirmou que a inclinação das trajetórias de crescimento não diverge entre os sexos para nenhuma das 15 estruturas analisadas (P-valor > 0,05 em todos os cenários). Ou seja, fêmeas e machos seguem o mesmo padrão vetorial de alocação de biomassa durante o desenvolvimento.

O distanciamento do padrão isométrico (alometria estrita) ocorreu de forma pontual, manifestando-se exclusivamente como alometria negativa ($b < 1$). Nas fêmeas, o complexo alar demonstrou hipoalometria acentuada, indicando que o comprimento (AC; $b = 0,5452$; $p = 0,0039$) e a largura da asa (AL; $b = 0,6840$; $p = 0,0014$) crescem em um ritmo significativamente menor que o tamanho do corpo. Nos machos, a largura da asa também apresentou alometria negativa (AL; $b = 0,5862$; $p = 0,0019$), padrão que curiosamente se repetiu na base do aparato locomotor, com o comprimento do fêmur crescendo mais devagar que o corpo (FC; $b = 0,6591$; $p = 0,0293$).

INTEGRAÇÃO E MODULARIDADE MORFOLÓGICA

A coordenação do desenvolvimento anatômico e a estruturação dos fenótipos de fêmeas e machos foram investigadas visualmente por matrizes de correlação de Pearson (*heatmaps*; Apêndice D e E) e validadas estatisticamente pela análise do Coeficiente RV (Tabela 3). A exploração dos blocos de correlação revelou uma profunda divergência na arquitetura de covariação morfológica entre os sexos.

Nos machos, observou-se uma matriz de correlação mais globalizada e altamente conectada, onde as dimensões da cápsula cefálica (como largura da cabeça e da cápsula dorsal) co-variam de forma consistente com as dimensões do tórax, asas e pernas (Figura 4). Nas fêmeas, o padrão visual é marcado por uma forte compartimentalização:

existem robustas correlações intra-módulo (por exemplo, alta integração estrutural entre o fêmur, a tíbia e os tarsos), mas uma evidente dissociação e independência entre as medidas da cabeça e o restante do corpo.

Para testar a validade estatística dessa divisão estrutural hipotética, o corpo dos espécimes foi particionado em dois grandes módulos: o cefálico e o torácico-apendicular (locomotor). O teste de permutação do Coeficiente RV confirmou quantitativamente as observações visuais. Nas fêmeas, a hipótese nula de independência multivariada entre os blocos não foi rejeitada (RV = 0,1249; p = 0,108). Esse resultado atesta a presença de uma forte modularidade fenotípica, indicando que a cabeça das fêmeas se desenvolve de maneira autônoma e desvinculada das restrições de tamanho do tórax e dos apêndices.

Em contraste, os machos apresentaram uma integração morfológica estrita (RV = 0,2656; p = 0,001). Nesse sexo, os módulos cefálico e locomotor não são independentes; as variações nas proporções da cabeça estão estatística e biologicamente atreladas ao desenvolvimento unificado das estruturas de voo e marcha.

VARIAÇÃO MULTIVARIADA E DISCRIMINAÇÃO

Para compreender a variação morfológica de forma integrada, as variáveis morfométricas foram matematicamente isoladas do efeito do tamanho corporal e submetidas a uma Análise de Componentes Principais (PCA). A projeção do morfoespaço baseado na "forma pura" (resíduos) revelou uma ampla sobreposição fenotípica entre machos e fêmeas. Embora os primeiros componentes capturem uma parcela significativa da variação estrutural (com o PC1 retendo 49,49% da variância total), não houve a formação de agrupamentos morfológicos isolados por sexo (Figura 5). Esse comportamento multivariado ratifica que, ao removermos a influência da escala (tamanho absoluto), o plano básico de forma de *P. testaceus* é majoritariamente conservado.

Para testar o limite da previsibilidade estatística e verificar se sutis padrões multivariados poderiam classificar os sexos, aplicou-se uma Análise de Função Discriminante (DFA). O modelo preditivo alcançou uma acurácia de validação cruzada (LOOCV) de apenas 60,0%. A distribuição de densidade do eixo discriminante (LD1) demonstra uma intersecção maciça entre as curvas de ambos os sexos (Figura 6), indicando uma taxa de classificação muito próxima ao mero acaso (50%).

Essa baixa capacidade discriminatória da forma pura consolida a hipótese anatômica delineada nas análises univariadas: o dimorfismo sexual desta espécie é comandado primordialmente pelo tamanho corporal absoluto e por divergências morfológicas estritamente localizadas (como no aparato translocatório torácico e apendicular), não existindo uma diferenciação de forma global intensa o suficiente para separar fêmeas e machos de maneira multivariada.

DISCUSSÃO

O INEDITISMO DA ABORDAGEM QUANTITATIVA EM STRATIOMYIDAE

A literatura sobre *Ptecticus* e Sarginae é dominada por trabalhos taxonômicos e descritivos. James e McFadden (1982), o catálogo de Woodley (2001) e as descrições

de Rozkošný e Kovac (1997, 1998) e Fachin, Amaral e Falaschi (2024) tratam da diagnose morfológica qualitativa (genitália, coloração, quetotaxia), sem tratamento estatístico multivariado da variação entre sexos, reproduzindo a lacuna apontada por Woodley (2001) quanto à escassez de chaves dicotômicas.
Este estudo é a primeira aplicação de protocolo morfométrico linear multivariado (MANCOVA, regressões SMA, Coeficiente RV, PCA/DFA) ao dimorfismo sexual em Sarginae. Mesmo os poucos precedentes em Stratiomyidae, como o estudo espectrofotométrico da coloração alar de *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758), não avaliam a partição entre isometria e alometria nem testam integração morfológica. O ineditismo está no rigor para decompor o dimorfismo em escala e proporção.
Esse rigor é reforçado pela repetibilidade obtida (R maior que 0,998, erro menor que 0,14%), acima do piso habitual (R maior ou igual a 0,95). O protocolo (quatro réplicas, ANOVA unidirecional), ausente nos trabalhos citados, confirma que a ausência de dimorfismo em cabeça e asa é padrão biológico real, não artefato metodológico.

ASSIMETRIA NA ATENÇÃO TAXONÔMICA: TEPHRITIDAE VERSUS FAMÍLIAS SAPRÓFAGAS

A disparidade entre o conhecimento acumulado para Tephritidae e a escassez para táxons saprófagos confirma-se na revisão. Para moscas das frutas, a morfometria geométrica de asas é ferramenta rotineira de sexagem, com dimorfismo alar robusto (ex.: *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)), muitos com classificação acima de 95%, refletindo o interesse aplicado (quarentena, manejo de pragas), ao contrário de Stratiomyidae, ecologicamente relevante mas sem apelo econômico direto.
Ao aplicar a mesma robustez (MANCOVA, FDR, LOOCV) a uma espécie de Sarginae, este trabalho reduz essa assimetria, embora a baixa acurácia da forma pura (60,0% via LOOCV) contraste com Tephritidae, sugerindo que o dimorfismo concentra-se na escala corporal absoluta, não em remodelamentos proporcionais.

O PADRÃO DE TAMANHO CORPORAL: MACHOS MAIORES, REGRA DE RENSCH E PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Machos maiores contraria a expectativa comum em Diptera de que a seleção por fecundidade favorece fêmeas maiores (Fairbairn, 1997; Blanckenhorn et al., 2007), padrão descrito por Sivinski et al. (2000) para *Anastrepha suspensa* (Loew, 1862).
O padrão inverso é compatível com a regra de Rensch, segundo a qual o SSD favorável a machos aumenta hiperalometricamente com o tamanho médio da espécie (Abouheif; Fairbairn, 1997). O padrão intraespecífico (SDI de até 9,48% no tórax) é compatível com competição intrassexual por sítios de oviposição. O comportamento territorial de *Merosargus* (Fontenelle; Viana-Silva; Martins, 2012) oferece hipótese plausível, ainda não testada para *Ptecticus*.
A seleção não é a única via geradora de SSD: diferenças de plasticidade fenotípica sexo-específica frente ao recurso larval podem, por si só, produzi-lo (Stillwell et al., 2010), relevante para *P. testaceus*, cujas larvas se desenvolveram em *M. indica* em decomposição. O delineamento não permite distinguir seleção sexual de plasticidade sexo-específica.

DIMORFISMO DE FORMA LOCALIZADO: TÓRAX E PERNAS COMO ESTRUTURAS CHAVE

O SShD real, restrito a tórax, fêmur e tíbia posterior, diverge do padrão comum em insetos, em que o dimorfismo de forma concentra-se em estruturas cefálicas ou apêndices copuladores. Em *P. testaceus*, a ausência de divergência em cabeça e asa,

explicada por escala, indica plano corporal conservador, com o aparato torácico-locomotor concentrando o sinal evolutivo.
Converge parcialmente com Budečević et al. (2021) em *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831), no qual a modularidade sexo-específica recaiu sobre compartimentos distintos (tórax versus abdome), princípio aplicável ao eixo torácico-apendicular identificado. Na perna, o SShD não se distribuiu uniformemente: fêmur (FC) e tíbia (TiC) exibiram alometria negativa e divergência de forma, enquanto basitarso (BC) e tarsômeros (T1C, T2C) permaneceram isométricos, gradiente consistente com Shingleton et al. (2007), segundo o qual segmentos apendiculares têm sensibilidade distinta à sinalização nutricional e hormonal. A concentração do dimorfismo nos segmentos proximais reforça a hipótese de competição intrassexual já discutida.

ISOMETRIA ALAR E CEFÁLICA: CANALIZAÇÃO DESENVOLVIMENTAL E MORFOMETRIA LINEAR VERSUS GEOMÉTRICA

A escolha pela morfometria linear, em vez da geométrica por landmarks, é relevante: a geométrica detecta divergências localizadas em vênulas mesmo sem diferença no centroide. A linear, por medir distâncias globais, é menos sensível a essa variação, explicando por que a asa não exibiu SShD após FDR, apesar de hipoalometria negativa em ambos os sexos (b = 0,5452 fêmeas; b = 0,5862 machos).
Isso é corroborado pela asa ter a menor variação intrassexual (CV mínimos: 5,66% e 5,82%), inferior à cápsula cefálica (até 18,30%) e ao flagelômero (até 14,14%), sugerindo canalização desenvolvimental mais estrita.
Assim, a isometria alar reflete tanto a resolução morfométrica quanto um padrão biológico de canalização, não conservadorismo evolutivo absoluto. Estudos futuros com morfometria geométrica de vênulas testariam se a hipoalometria coexiste com divergências mais sutis.

MODULARIDADE E INTEGRAÇÃO SEXO-ESPECÍFICAS: UM ACHADO POUCO EXPLORADO

O resultado mais original é que a arquitetura de integração morfológica de P. testaceus é ela própria sexualmente dimórfica: fêmeas exibiram modularidade suportada entre blocos cefálico e locomotor (RV = 0,1249; p = 0,108), e machos integração estrita (RV = 0,2656; p = 0,001). A literatura de Klingenberg (2008, 2009) raramente reporta comparações sexo-específicas populacionais. A divergência do padrão de covariação entre sexos amplia o arcabouço de Klingenberg (2016), sugerindo que a canalização do desenvolvimento pode operar sob regimes distintos por sexo, compatível com maior pressão de seleção sexual sobre voo e locomoção em machos.

LIMITAÇÕES E DIREÇÕES FUTURAS

A sobreposição fenotípica na PCA da forma pura e a acurácia modesta da DFA (60,0% via LOOCV) reforçam que o dimorfismo é fundamentalmente de escala corporal, contrastando com espécies em que a forma pura classifica quase todos os indivíduos, como morcegos frugívoros (*Sturnira lilium* (E. Geoffroy, 1810)). Isso reforça a necessidade de estudos comparativos intragenéricos em Sarginae, hoje inexistentes.
Limitação conceitual: as 16 variáveis não incluem o abdome nem estruturas ligadas à capacidade reprodutiva feminina (terminália, volume abdominal), *proxy* clássico da hipótese de fecundidade em Diptera. A rejeição implícita dessa hipótese apoia-se na ausência de sinal nas estruturas avaliadas, não em teste direto; medidas abdominais futuras são necessárias. As hipóteses sobre competição intrassexual, por analogia com

Merosargus, permanecem especulativas, sem observações comportamentais diretas em *P. testaceus*.

SIGNIFICÂNCIA APLICADA
Os resultados têm valor prático para o monitoramento de Stratiomyidae no Parque Estadual Dunas de Natal, origem dos espécimes. O dimorfismo, concentrado em tórax e fêmur posterior, de fácil mensuração e baixo erro (repetibilidade maior que 0,998), sugere protocolos de sexagem rápida em campo, sem dissecção genital ou estereomicroscopia, facilitando estudos de longo prazo em remanescentes protegidos, contribuindo à ZPA-02 e ao papel do Parque das Dunas no conhecimento sobre táxons saprófagos negligenciados.
Em síntese, este trabalho preenche uma lacuna dupla: metodológica, ao introduzir um protocolo de partição tamanho/forma para Diptera saprófagos; e biológica, ao fornecer a primeira caracterização quantitativa do dimorfismo sexual em Sarginae, com implicações para fecundidade, competição intrassexual, plasticidade fenotípica e integração desenvolvimental na evolução do dimorfismo sexual em Stratiomyidae.

Conclusão

A presente pesquisa cumpriu com êxito o objetivo de avaliar e quantificar o dimorfismo sexual em *P. testaceus*, superando as descrições puramente qualitativas da subfamília Sarginae com a aplicação inédita de um protocolo morfométrico linear multivariado. Os elevados índices de repetibilidade e o baixo erro de medição atestam a confiabilidade da metodologia, assegurando que as divergências detectadas representam fenômenos biológicos genuínos.

Os resultados demonstraram que a diferenciação fenotípica da espécie é regida primordialmente pelo tamanho corporal absoluto, apresentando um viés de crescimento masculino que contraria a regra de seleção por fecundidade frequentemente observada em Diptera. Machos são significativamente maiores, com os maiores distanciamentos brutos localizados no tórax e nos apêndices locomotores. Esse padrão sugere a atuação de fortes pressões evolutivas específicas, possivelmente associadas à competição intrassexual por parceiras ou territórios.

Ao isolar o efeito isométrico da escala, comprovou-se que o dimorfismo de forma real é altamente restrito. A divergência de proporções limitou-se ao comprimento torácico e aos segmentos proximais das pernas posteriores, corroborando que o aparato translocatório concentra o sinal evolutivo de diferenciação. Em contrapartida, estruturas cefálicas e o complexo alar exibiram isometria morfológica, apontando para uma canalização desenvolvimental rigorosa imposta pelas exigências funcionais de sustentação de voo e processamento sensorial.

O estudo revelou também que a própria arquitetura de integração fenotípica é sexualmente dimórfica. As fêmeas expressam uma pronunciada modularidade que dissocia o desenvolvimento cefálico do restante do corpo, enquanto os machos operam sob integração morfológica estrita e globalizada. Essa diferença evidencia que os

processos de regulação anatômica atuam sob demandas adaptativas distintas para cada sexo.

A análise multivariada ratificou a premissa univariada, pois a sobreposição espacial na PCA e a baixa acurácia do modelo discriminante demonstram que sutis diferenças de proporção não segregam os sexos isoladamente. De forma aplicada, a forte dependência do tamanho absoluto nas variáveis do tórax e do fêmur viabiliza protocolos de sexagem rápida em campo por biometria simples, otimizando o monitoramento populacional.

Em síntese, o trabalho preenche uma lacuna metodológica ao mapear a complexidade alométrica e integrativa de um díptero saprófago. A pesquisa fornece uma base empírica sólida para a compreensão da evolução morfológica em Stratiomyidae e abre precedentes para investigações sobre os mecanismos evolutivos nestas populações neotropicais.

Referências

ABOUHEIF, E.; FAIRBAIRN, D. J. A comparative analysis of allometry for sexual size dimorphism: assessing Rensch's rule. **The American Naturalist**, v. 149, n. 3, p. 540-562, 1997.

ALUJA, M. et al. Behavior of flies in the genus Anastrepha (Diptera: Tephritidae). **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 269-296, 2000.

ARAÚJO, E. L.; FERNANDES, M. G. **Moscas-das-frutas no Brasil: diversidade, ecomorfologia e manejo.** Mossoró: Ed. UFERSA, 2023.

BASÍLIO, A. C. **Ecomorfologia e biologia reprodutiva de Tephritidae e Stratiomyidae (Diptera) no Rio Grande do Norte.** 2026. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Genética) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2026.

BLANCKENHORN, W. U. The evolution of body size: what keeps organisms small? **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 4, p. 385-407, 2000.

BLANCKENHORN, W. U. et al. Proximate causes of sexual size dimorphism in Diptera. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 92, n. 3, p. 495-507, 2007.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

BROWN, B. V. et al. **Manual of Central American Diptera**. v. 1. Ottawa: NRC Research Press, 2018.

BUDEČEVIĆ, S. et al. Sexual dimorphism and morphological modularity in Acanthoscelides obtectus (Say, 1831) (Coleoptera: Chrysomelidae): a geometric morphometric approach. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 350, 2021.

CANAL, N. A. et al. Morphometric differentiation of species of the Anastrepha fraterculus group (Diptera: Tephritidae). **Systematic Entomology**, v. 43, n. 1, p. 160-172, 2018.

CANEJO, R. P. et al. Sexual dimorphism and morphological variation in Anastrepha zenildae (Diptera: Tephritidae) populations. **Neotropical Entomology**, v. 53, n. 2, p. 312-324, 2024.

CHANG, C. Wing vibration signals and mating behavior in fruit flies. **Journal of Insect Behavior,** v. 33, p. 112-124, 2020.

COURTNEY, G. W. et al. ***Biodiversity of Diptera.*** In: FOOTTIT, R. G.; ADLER, P. H. (Eds.). **Insect Biodiversity: Science and Society.** Hoboken: Wiley-Blackwell, 2017. p. 229-278.

DUDLEY, R. **The biomechanics of insect flight: form, function, evolution.** Princeton: Princeton University Press, 2002.

FABRICIUS, J. C. **Entomologia systematica emendata et aucta.** v. 4. Hafniae [Copenhague]: C. G. Proft, 1794. 472 p.

FACHIN, D. A.; AMARAL, E. M.; FALASCHI, R. L. Puparium of Merosargus cingulatus Schiner, 1868 and Ptecticus lanei James, 1941 (Diptera: Stratiomyidae: Sarginae), with new geographical records for the species and a list of all known immatures of the subfamily. **Zootaxa**, v. 5406, n. 3, p. 421-440, 2024.

FAIRBAIRN, D. J. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of morphological traits. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, p. 659-687, 1997.

FONTENELLE, J. C. R.; VIANA-SILVA, F. E. C.; MARTINS, R. P. Use of plant resources by Merosargus (Diptera, Stratiomyidae, Sarginae) larvae. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, Article ID 690203, p. 1-10, 2012.

JAMES, M. T.; McFADDEN, M. W. The Sarginae (Diptera: Stratiomyidae) of Middle America. **Melanderia**, Pullman, v. 40, p. 1-50, 1982.

KLINGENBERG, C. P. Morphological integration and developmental modularity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 115-132, 2008.

KLINGENBERG, C. P. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. **Evolution & Development**, v. 11, n. 4, p. 405-421, 2009.

KLINGENBERG, C. P. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. **Development Genes and Evolution**, v. 226, n. 3, p. 113-137, 2016.

KNELL, R. J.; MOCZEK, A. P. The evolution of allometry in sexual traits. **Evolutionary Ecology**, v. 31, p. 211-228, 2017.

LAND, M. F.; NILSSON, D. E. **Animal eyes**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000.

NASCIMENTO, A. S. et al. Monitoramento de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado.** Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000. p. 109-112.

PREZOTTO, L. F. et al. What Can Integrated Analysis of Morphological and Genetic Data Still Reveal about the Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) Cryptic Species Complex? **Insects**, v. 10, n. 11, p. 408, 2019.

REGUERA, P. Sexual size dimorphism. In: MORO, E.; JUNCÀ, M. (Eds.). **Sexual dimorphism.** Palma de Mallorca: Universitat de les Illes Balears, 2006. p. 9-17.

ROZKOŠNÝ, R. **A biosystematic study of the European Stratiomyidae (Diptera).** v. 1. Introduction, Beridinae, Sarginae, Stratiomyinae. Series Entomologica 21. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1982.

ROZKOŠNÝ, R.; KOVAC, D. Ptecticus minimus, a new species of Sarginae from West Malaysia including the description of its larva and puparium (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). **The Raffles Bulletin of Zoology**, v. 45, n. 1, p. 39-51, 1997.

ROZKOŠNÝ, R.; KOVAC, D. Descriptions of bamboo-inhabiting larvae and puparia of Oriental soldier flies Ptecticus brunettii and P. flavifemoratus (Diptera: Stratiomyidae: Sarginae) with observations on their biology. **European Journal of Entomology,** v. 95, p. 65-86, 1998.

SHINGLETON, A. W. et al. Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. **BioEssays**, v. 29, n. 6, p. 536-548, 2007.

SILVA, N. M. et al. **Guia de procedimentos para coleta e criação de moscas-das-frutas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. (Documentos, 192).

SIVINSKI, J. et al. Flight and reproductive morphology of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with different mating strategies. **Florida Entomologist**, v. 83, n. 3, p. 235-245, 2000.

STILLWELL, R. C.; FOX, C. W. Complex patterns of selection on size and sexual size dimorphism in a seed-feeding beetle. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, n. 2, p. 576-585, 2007.

STILLWELL, R. C.; BLANCKENHORN, W. U.; TEDER, T.; DAVIDOWITZ, G.; FOX, C. W. Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size

dimorphism in insects: from physiology to evolution. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 227-245, 2010.

STORK, N. E. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 31-45, 2018.

THORNBERRY, R.; SARGENT, R. D. Sexual selection on wing morphology in lekking flies. **Behavioral Ecology**, v. 25, n. 4, p. 890-898, 2014.

WOODLEY, N. E. A world catalog of the Stratiomyidae (Insecta: Diptera). **Myia**, v. 11, p. 1-473, 2001.

ZEIL, J. Sexual dimorphism in the visual system of flies: the compound eyes and giant neurons. **Journal of Comparative Physiology**, v. 150, n. 3, p. 395-41.

Anexos



Apêndice A



Apêndice B



Apêndice C



Apêdice D



Apêndice E1



Apêndice E2



Apêndice E3



Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6



Tabela 1



Tabela 2



Tabela 3

CÓDIGO: SB0960

AUTOR: NICOLE VITORIANO DE MORAIS

COAUTOR: HILDA RAIANNE SILVA DE MELO

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Composição e organização de materiais em ninhos de Fluvicola nengeta em ambiente urbano no campus da UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

Resumo

A urbanização modifica a disponibilidade de recursos, favorecendo a incorporação de materiais antropogênicos aos ninhos de aves urbanas, como a lavadeira-mascarada (Fluvicola nengeta). O presente estudo teve como objetivo descrever a composição e a abundância dos materiais incorporados aos ninhos de F. nengeta coletados em área urbana. O estudo foi realizado no campus Natal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Foram coletados seis ninhos, dos quais três foram submetidos à dissecação manual e à quantificação dos materiais constituintes, classificados em três categorias: natural-vegetal, natural-animal e antrópico. Os ninhos analisados (n = 3) apresentaram massa média de 28,47 ± 6,92 g. Os materiais natural-vegetais representaram a maior proporção da massa (21,67 ± 5,72 g), seguidos pelos antrópicos (2,79 ± 1,24 g) e natural-animais (2,19 ± 0,69 g). Entre os materiais antrópicos, foram identificados barbantes, fibras sintéticas, plásticos, papéis e metal, enquanto penas de outras aves sinantrópicas foram encontradas na região interna dos ninhos. Quanto ao sucesso reprodutivo, cinco dos seis ninhos apresentaram evidências de insucesso, não sendo possível estabelecer relação causal com a incorporação de resíduos. Concluímos que F. nengeta mantém materiais naturais como principal componente dos ninhos, mas incorpora recursos antrópicos, evidenciando a necessidade de investigar seus possíveis efeitos sobre o sucesso reprodutivo.

Palavras-chave: Aves urbanas. Nidificação. Reprodução.

TITLE: Composition and Organization of Materials in Fluvicola nengeta Nests in an Urban Environment on the UFRN Campus, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

Abstract

Urbanization alters resource availability, favoring the incorporation of anthropogenic materials into the nests of urban birds, such as the Masked Water-Tyrant (Fluvicola nengeta). This study aimed to describe the composition and abundance of materials incorporated into F. nengeta nests collected in an urban area. The study was conducted on the Natal campus of the Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil. Six nests were collected, three of which were manually dissected and their materials quantified. Materials were classified as natural-vegetal, natural-animal, and anthropogenic. The analyzed nests (n = 3) had a mean mass of 28.47 ± 6.92 g. Natural-vegetal materials represented the largest proportion of nest mass (21.67 ± 5.72 g), followed by anthropogenic (2.79 ± 1.24 g) and natural-animal materials (2.19 ± 0.69 g). Anthropogenic materials included strings, synthetic fibers, plastics, paper, and metal, while feathers from other synanthropic birds were found inside the nests. Five of the six nests showed evidence of reproductive failure, but no causal relationship with anthropogenic materials could be established. We conclude that F. nengeta maintains natural materials as the main component of its nests while also incorporating anthropogenic resources, highlighting the need for further research on their potential effects on reproductive success.

Keywords: Urban birds. Nesting. Reproduction.

Introdução

O período geológico atual, o antropoceno, é caracterizado por modificações antrópicas nos ecossistemas. Dentre essas transformações, destacam-se a produção e o descarte de detritos provenientes de atividades industriais e domésticas. Em centros urbanos, o descarte inadequado de resíduos sólidos amplia os riscos de emaranhamento, ingestão e aprisionamento na fauna (Thompson et al., 2009; Santos et al., 2021), além de provocar alterações comportamentais e fisiológicas (Suárez-Rodríguez et al., 2014).

Entre os grupos mais suscetíveis estão as aves, cujos comportamentos respondem às modificações ambientais (Gregory e Van Strien, 2010). Diferentes interações entre aves e materiais poluentes têm sido registradas, incluindo a ingestão de microplásticos e partículas sintéticas (Azevedo-Santos et al., 2022) e a incorporação de resíduos antropogênicos aos ninhos (Borges e Marini, 2010; Jagiello et al., 2019; Blettler e Mitchell, 2021; Monteiro et al., 2024). A presença de materiais sintéticos modifica propriedades estruturais e funcionais dos ninhos, comprometendo sua integridade, camuflagem e capacidade de termorregulação (Mainwaring et al., 2014). Ninhos contendo resíduos antropogênicos apresentam maior suscetibilidade à predação em comparação àqueles constituídos apenas por materiais naturais (Mansfield et al., 2024), possivelmente devido às cores vibrantes e às propriedades reflexivas desses materiais, que aumentam a facilidade de percebê-los no ambiente. Em regiões de clima quente, materiais sintéticos podem ainda elevar a temperatura interna do ninho, aumentando o risco de estresse térmico para ovos e filhotes (Townsend e Barker, 2014). Além disso, tanto indivíduos adultos quanto filhotes podem emaranhar-se em fios, barbantes e fragmentos plásticos incorporados às estruturas de nidificação (Bond et al., 2012; Blettler e Mitchell, 2021), ocasionando ferimentos, limitação motora e mortalidade (Battisti et al., 2019).

Entre as aves que utilizam ambientes urbanos, destaca-se Fluvicola nengeta (lavadeira-mascarada), passeriforme de ampla distribuição, associado principalmente às regiões Norte e Nordeste do Brasil e frequente em ambientes abertos e antropizados (Sick, 1997). A espécie apresenta plasticidade na escolha de substratos para nidificação, utilizando vegetação e estruturas artificiais (Silva et al., 2018a; 2018b), além de incorporar materiais antropogênicos, como plástico e papel, aos ninhos em ambientes urbanos (Silva et al., 2018a; Fernandes et al., 2007). Seus ninhos apresentam formato ovalado, com entrada lateral e revestimento interno de penas (Pacheco e Simon, 1995).

Apesar de sua ampla distribuição, são poucos os estudos sobre a biologia reprodutiva de F. nengeta, que se concentram principalmente na arquitetura dos ninhos, reprodução, cuidado parental e comparação entre sítios reprodutivos (Pacheco e Simon, 1995; Silva-Junior e Melo, 2009; Tomaz et al., 2009; Fernandes, 2007; Silva et al., 2018a; 2018b). Neste sentido, permanecem pouco exploradas análises que caracterizem a composição de materiais e arquitetura dos ninhos. Essa lacuna torna-se evidente para a avifauna neotropical, para a qual ainda são escassos os estudos que caracterizem e quantifiquem a composição dos materiais antropogênicos incorporados aos ninhos, bem como discutam suas implicações ecológicas em ambientes urbanos (Jagiello et al., 2022).

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo descrever a abundância e a composição dos detritos antropogênicos incorporados aos ninhos de Fluvicola nengeta, por meio da dissecação de ninhos coletados em áreas urbanas e periurbanas inseridas em ecossistemas de Restinga no Nordeste brasileiro.

Metodologia

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na área da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), campus Natal (Fig. 1), que apresenta uma área total de 123 hectares e localiza-se no município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. O clima da região é classificado como tropical litorâneo úmido, ou como quente úmido, segundo a classificação climática de Koppen, caracterizado por uma temperatura média anual elevada, em torno de 26 °C, e precipitação média aproximada de 1.200 mm anuais, com período chuvoso concentrado entre os meses de abril e agosto e período seco entre setembro e março (Natal, 2010).

A região do Campus está inserida no domínio da Mata Atlântica, apresentando uma área de remanescente de vegetação nativa do bioma, com fitofisionomia de Restinga. No campus, há pequenos fragmentos vegetais que podem ser caracterizados como fechados, semiabertos e abertos, conforme a disposição da vegetação e a exposição do solo (Medeiros e Carvalho, 2017).

Além deste espaço, há extensas áreas antropizadas compostas por edificações institucionais, vias pavimentadas e estacionamentos. Mesmo nas áreas urbanizadas, observa-se a preservação de árvores nativas de grande porte, como a craibeira (Tabebuia

aurea), pau-brasil (Paubrasilia echinata), jucá (Libidibia ferrea), o ipê-amarelo (Handroanthus spp.), a catingueira (Poincianella pyramidalis) e outros espécimes.

2.2 COLETA DE DADOS

Para a localização dos ninhos na área de estudo, foi utilizada a metodologia proposta por Martin e Geupel (1993), que consiste na busca ativa, através da observação e do vasculhamento da vegetação, realizada semanalmente. Além disso, observou-se o comportamento dos indivíduos adultos quanto ao transporte de material para construção de ninhos e alimentos para os ninhegos.

Os ninhos encontrados foram classificados como ativos quando apresentavam ovos ou ninhegos e como inativos quando vazios. Para verificação destas categorias, utilizamos câmeras endoscópicas com o auxílio de hastes metálicas (Fig. 2). Ninhos classificados como ativos foram georreferenciados com GPS para que pudessem ser monitorados em intervalos regulares de 5 dias, como proposto por Marini et al. 2010. Quando constatado o fim do processo de nidação após confirmação do status do ninho vazio por três visitas consecutivas, os ninhos da espécie de interesse do presente estudo foram coletados manualmente e acondicionados em caixas de papelão para posterior análise da composição de materiais e detritos antrópicos.

2.3 DISSECAÇÃO DOS NINHOS

Após as coletas, os ninhos foram etiquetados para identificação, localização e data de coleta. Posteriormente, cada ninho foi pesado em balança digital antes da dissecação (variável designada como "Peso Total Intacto"), e suas dimensões foram medidas com réguas. Foram registradas a altura e a largura da entrada do ninho, além da profundidade.

A dissecação manual dos ninhos foi iniciada em fevereiro de 2026, com auxílio de pinças para separação dos componentes. Para a classificação dos materiais, a metodologia utilizada teve como base as categorias propostas por Roy e Dominoni (2024). O estudo propõe três categorias originais: materiais naturais (gravetos, musgos e gramíneas), materiais de origem natural animal (penas, lã e pelos) e materiais antrópicos.

Para este estudo, foram classificados como materiais natural-vegetal: gravetos, raízes, folhas, cascas, sementes, musgos e gramíneas; natural-animal: penas, lã, pelos e fezes; antrópicos: resíduos sólidos em geral, como plásticos, papéis e fios.

Além disso, classificamos o posicionamento de cada item, como presentes na parte externa e câmara incubatória. Após a dissecação, todos os materiais de cada categoria foram pesados em balança digital de precisão para quantificação da proporção em massa.

Resultados e Discussões

Foram coletados seis ninhos de Fluvicola nengeta em diferentes áreas do campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), no período de novembro de 2025 a julho de 2026 (Figura 3). Os ninhos foram identificados como N1 a N6 conforme a ordem de localização. N1 foi encontrado em 17 de novembro de 2025 e N2 em 7 de janeiro de 2026, sendo ambos coletados em 25 de fevereiro de 2026. N3 foi localizado em 5 de março, monitorado por aproximadamente um mês e coletado em 10 de abril. N4 foi localizado em 12 de março, próximo ao N2, monitorado até 7 de maio, quando caiu da árvore de suporte e foi coletado. N5 foi encontrado em 25 de maio, na mesma árvore utilizada pelo N3, e N6 em 8 de junho, sendo coletado em 2 de julho de 2026. Até o momento, apenas N1, N2 e N3 foram submetidos à dissecação para caracterização e quantificação dos materiais.

3.1 COMPOSIÇÃO E ARQUITETURA DOS NINHOS

Todos os três ninhos dissecados, coletados após o término da atividade reprodutiva e sua desativação, apresentaram resíduos de origem antrópica incorporados à estrutura (Fig. 4). Foram identificados barbantes, linhas de costura, papéis e plásticos, em quantidades distintas entre os ninhos. Esses materiais estavam entrelaçados aos componentes vegetais tanto na porção externa quanto na câmara de incubação, indicando sua integração à estrutura durante a construção. Materiais semelhantes foram registrados por Fernandes et al. (2007), que observaram plástico, barbante e emaranhados de cabelo em ninhos de F. nengeta. A presença de resíduos nos três ninhos sugere seu uso recorrente pela espécie nas áreas amostradas.

A recorrência desses materiais nos diferentes locais estudados pode estar relacionada às características do próprio campus da UFRN, que apresenta áreas de vegetação, edificações, vias pavimentadas e circulação de pessoas, favorecendo a disponibilidade de recursos de origem antrópica. Esse padrão também evidencia a plasticidade de F. nengeta na ocupação de ambientes antropizados e na utilização de diferentes materiais para nidificação

Os ninhos apresentaram arquitetura semelhante (Tabela 1). A altura da entrada foi constante, com 7,0 cm, enquanto a largura variou de 5,0 a 6,5 cm, próxima ao valor de 5,5 cm observado por Maia (2013). A profundidade variou de 9,9 a 11,0 cm (10,3 ± 0,64 cm), aproximando-se da média de 11 ± 0,6 cm registrada por Silva et al. (2018b). As dimensões, portanto, foram compatíveis com aquelas previamente descritas para a espécie.

A massa inicial variou de 22,2 a 35,9 g, com média de 28,47 ± 6,92 g (Fig. 5). A diferença de 13,7 g entre o ninho mais leve e o mais pesado correspondeu a aproximadamente 62% da massa do menor ninho. Essa variação pode refletir diferenças na quantidade e no tipo de materiais utilizados. Entretanto, o reduzido número amostral não permite determinar se essas diferenças estão relacionadas a características individuais dos casais ou à disponibilidade local de recursos, especialmente porque os três ninhos foram encontrados em pontos distintos do campus.

Apesar da variação de massa, os três ninhos apresentaram predominância de materiais vegetais, principalmente gravetos, raízes, folhas e gramíneas. Assim, a incorporação de resíduos não substituiu os principais componentes naturais da estrutura. Esse resultado é consistente com Roy e Dominoni (2024), que observaram que musgos e gramíneas

permaneceram como principais componentes mesmo em ninhos urbanos, apesar da maior incorporação de materiais antrópicos. Silva et al. (2018b) também verificaram predominância de materiais vegetais em ninhos de F. nengeta, correspondendo a 60 á 77% dos componentes utilizados. A menor participação dos resíduos antrópicos, mesmo em ambiente urbano, sugere que esses materiais são incorporados de forma complementar. Esse padrão é compatível com estudos que relacionam o uso de materiais antrópicos à sua disponibilidade e proximidade das áreas de reprodução (Borges e Marini, 2010; Jagiello et al., 2019).

No Ninho 1 (Fig. 6), os materiais naturais-vegetais totalizaram 20,61 g, correspondendo a 82,77% da massa total, enquanto os materiais naturais-animais corresponderam a 2,01 g (8,07%) e os antropogênicos a 2,28 g (9,16%) (Fig. 7). Gravetos e raízes foram os principais componentes, totalizando 18,5 g, dos quais 16,1 g estavam na porção externa e 2,4 g na interna (Fig. 8), correspondendo a 74,30% da massa do ninho. Também foram registradas folhas (1,16 g), gramíneas (0,80 g) e cascas (0,16 g), concentradas principalmente na região externa. Penas, pelos e lã, que somaram 1,60 g e se concentraram na porção interna. Também foram encontrados fragmentos de formigas ou ootecas de aranhas (0,36 g) e fezes (0,05 g). Esses materiais foram classificados pela contribuição à massa do ninho, mas não foi possível determinar se os animais constituíam recursos selecionados para a construção ou se utilizavam a estrutura como abrigo.

A distribuição dos materiais entre as porções externa e interna apresentou um padrão funcional. A região externa foi dominada por gravetos e raízes, enquanto a câmara de incubação concentrou materiais mais leves e macios, como folhas, penas, pelos e lã. Biddle et al. (2017) apontam que materiais rígidos tendem a compor a porção externa, fornecendo suporte e proteção, enquanto materiais com maior capacidade de isolamento são utilizados no revestimento interno (Hansell, 2000). O padrão observado sugere, portanto, seleção de materiais de acordo com sua função estrutural.

No Ninho 1, os materiais antropogênicos totalizaram 2,28 g, sendo 2,10 g na região externa, principalmente barbantes e plásticos, e 0,18 g na região interna, representados sobretudo por papéis e plásticos finos. Foi identificado um grampo metálico (Fig. 9a), único registro de metal entre os ninhos, além de uma fibra sintética com mais de 30 cm na região externa (Fig. 9b). Embora a literatura destaque principalmente lesões causadas por fios, barbantes e cordas sintéticas, capazes de provocar necrose e morte de filhotes (Townsend e Barker, 2014), a presença de um objeto metálico introduz outra possibilidade de risco físico. Não foram observadas lesões associadas ao grampo, mas objetos rígidos ou perfurantes incorporados aos ninhos merecem investigação, especialmente quanto aos riscos aos filhotes.

O Ninho 2 (Fig. 10) também apresentou predominância de materiais naturais-vegetais (Fig. 11), que totalizaram 16,53 g (82,5% da massa), seguidos pelos materiais natural-animal, com 1,60 g (8,0%), e antropogênicos, com 1,90 g (9,5%). Gravetos e raízes somaram 14,9 g, sendo 13,1 g na porção externa e 1,8 g na interna (Fig. 12), correspondendo a 74,4% da massa total. Essa proporção foi semelhante à observada no N1 (74,3%), reforçando a importância desses materiais como base estrutural dos ninhos. As gramíneas totalizaram 1,42 g (7,1%), principalmente na porção externa, enquanto folhas corresponderam a 0,19 g (0,9%) e sementes a 0,02 g.

Penas, pelos e lã corresponderam a 1,10 g (5,5%) e concentraram-se principalmente na região interna (0,70 g). Também foram registradas ootecas de aranhas (0,20 g) e fezes (0,30 g), estas últimas restritas à câmara de incubação. A concentração de materiais macios no interior novamente sugere função de revestimento.

Os materiais antropogênicos do N2 totalizaram 1,90 g (9,5%), concentrados na porção externa (1,70 g), onde foram encontrados plásticos rígidos e fibrosos, incluindo uma cerda de vassoura (Fig. 13a). Na região interna foram registrados 0,20 g de materiais mais leves e flexíveis, como papéis e plásticos finos. Esse padrão é semelhante ao descrito por Biddle et al. (2015), para Turdus merula, e Kang (2022), para Cyanopica cyanus, nos quais materiais mais rígidos foram preferencialmente associados à porção externa e materiais mais macios ao revestimento interno.

No revestimento interno do N2 foram identificadas penas de Thraupis sayaca (Fig. 14a) e Thraupis palmarum (Fig. 14b). Silva et al. (2018b) também registraram penas de outras espécies em ninhos de F. nengeta, sugerindo possível relação entre coloração e camuflagem, embora sem identificar a origem das penas. A identificação das espécies no presente estudo demonstra que F. nengeta utiliza recursos provenientes de aves presentes no ambiente de nidificação. Como T. sayaca e T. palmarum são frequentes em áreas urbanizadas e ocorrem no campus da UFRN, a disponibilidade local pode influenciar a composição do revestimento. Assim, além da possível influência da coloração, a seleção de penas pode estar relacionada à oferta desses materiais e à comunidade de aves presente na área.

O Ninho 3 (Fig. 15) apresentou massa inicial de 35,9 g, sendo o mais pesado. Os materiais naturais totalizaram 27,88 g (79,6%), os natural-animais 2,96 g (8,4%) e os antropogênicos 4,20 g (12,0%) (Fig. 16). Embora tenha mantido a predominância de materiais naturais, o N3 apresentou a maior proporção de resíduos antropogênicos entre os três ninhos, superior aos valores observados no N2 (9,5%) e no N1 (9,16%). Gravetos e raízes totalizaram 21,2 g, sendo 19,6 g na porção externa e 1,6 g na interna (Fig. 17), correspondendo a 60,5% da massa total. Em termos absolutos, foi a maior quantidade entre os três ninhos, superando N1 (18,5 g) e N2 (14,9 g); entretanto, sua proporção foi menor devido ao maior aporte de outros materiais. Entre os componentes vegetais, destacaram-se gramíneas (4,4 g; 12,6%), principalmente na região externa, e folhas (2,08 g; 5,9%). Cascas (0,15 g) e sementes (0,05 g) ocorreram em pequenas quantidades.

Os materiais natural-animal totalizaram 2,96 g, sendo penas, pelos e lã responsáveis por 2,2 g (6,3%). Esses materiais ocorreram na câmara de incubação e, no N3, também em quantidade relevante na porção externa (1,3 g). Outros materiais animais somaram 0,76 g. Não foram registradas fezes neste ninho.

Os materiais antropogênicos do N3 totalizaram 4,20 g (12,0%), maior valor absoluto e proporcional entre os três ninhos. Assim como nos demais, concentraram-se na região externa (4,0 g), enquanto 0,20 g ocorreram internamente. Foi encontrado um barbante branco de 179 cm de comprimento (Fig. 18), dobrado sobre a porção externa e incorporado aos demais componentes. Embora estudos anteriores tenham registrado materiais antrópicos em ninhos de F. nengeta (Fernandes et al., 2007; Tomaz et al., 2009; Maia, 2013), medidas individuais dos fragmentos são pouco documentadas. Entre os materiais antropogênicos que foram identificados no Ninho 3, foi encontrado um

barbante branco com 179 cm de comprimento (Fig. 18), constituindo o material de maior comprimento registrado entre os ninhos. O fragmento estava dobrado sobre a porção externa da estrutura, junto aos demais materiais utilizados na construção do ninho, como pode ser visto na (Fig. 9). Esse resultado destaca a necessidade de que futuros estudos também quantifiquem dimensões dos materiais antrópicos isolados, uma vez que o comprimento desses resíduos pode estar relacionado ao risco de emaranhamento e a outros impactos sobre o sucesso reprodutivo.

Outro registro foi uma fibra sintética azul vibrante, com aproximadamente 28 cm (Fig. 19). A utilização de materiais plásticos azuis já foi observada em outras aves, como Psarocolius decumanus, cujos ninhos apresentaram fibras azuis de polietileno (Lopes et al., 2024). Em F. nengeta, Silva (2023) registrou fitilhos plásticos azul-claros utilizados na região. A diferença de tonalidade observada no presente estudo pode indicar outra fonte do material. A ocorrência de fibras com diferentes características reforça a possibilidade de utilização oportunista de recursos antropogênicos disponíveis no ambiente. .

No N3 também foram identificadas penas de Athene cunicularia na câmara de incubação (Fig. 20). A espécie ocorre no campus da UFRN, especialmente em áreas abertas, o que contribui para a disponibilidade desse recurso. Registros anteriores descreveram o revestimento interno de F. nengeta como composto por penas, geralmente brancas (Pacheco e Simon, 1995; Tomaz et al., 2009; Maia, 2013). Lopes (2013) identificou penas de garça, enquanto Silva et al. (2018b) registraram diferentes colorações, mas sem determinar as espécies de origem. A identificação de T. sayaca, T. palmarum e A. cunicularia no presente estudo amplia a caracterização dos recursos utilizados pela espécie e sugere que a disponibilidade local de penas pode contribuir para sua seleção.

Em conjunto, os resultados indicam que a incorporação de resíduos antropogênicos é recorrente nos ninhos de F. nengeta no campus da UFRN, mas não substitui os principais componentes vegetais. A quantificação da massa e a análise da distribuição dos materiais mostram um padrão consistente: gravetos e raízes predominam na porção externa, enquanto materiais leves e macios se concentram na câmara de incubação. Os resíduos antrópicos também foram predominantemente externos, embora alguns materiais tenham sido incorporados ao revestimento interno. Esses resultados demonstram que a dissecação permite identificar aspectos funcionais da arquitetura dos ninhos que não seriam observados apenas por sua avaliação externa.

3.2 OBSERVAÇÕES SOBRE O SUCESSO REPRODUTIVO

Dos seis ninhos monitorados, cinco apresentaram evidências de insucesso reprodutivo, enquanto o desfecho de um não pôde ser determinado. O N1 foi encontrado vazio, não sendo possível inferir se houve eclosão, abandono, predação ou outro desfecho. O N2 foi abandonado sem ovos ou filhotes. O N3 continha dois filhotes mortos, sendo um F. nengeta e um Molothrus bonariensis, caracterizando parasitismo. Posteriormente, um novo ninho foi construído no mesmo local e na mesma árvore (N5), também apresentando evidências de insucesso, padrão de proximidade entre ninhos já observado por Maia (2013). O N4 foi encontrado caído da árvore, contendo um ovo rachado. O N6 foi abandonado e apresentava um ovo na câmara de incubação. Assim, entre os ninhos

cujo desfecho pôde ser determinado, não foram registradas evidências de sucesso reprodutivo.

Silva et al. (2018b) observaram maior sucesso reprodutivo em ninhos de F. nengeta construídos sobre estruturas antrópicas em comparação com aqueles localizados em áreas de vegetação abundante, possivelmente pela menor presença de predadores terrestres. No presente estudo, esse padrão não foi observado, pois todos os ninhos com desfecho conhecido apresentaram insucesso, embora por diferentes razões. Os resultados indicam que a ocupação de ambientes antropizados não garante maior sucesso reprodutivo e que outros fatores podem influenciar o desempenho da espécie. Entretanto, o tamanho amostral reduzido e a ausência de acompanhamento experimental não permitem estabelecer relações de causalidade entre a incorporação de resíduos, o ambiente de nidificação e o sucesso reprodutivo. Estudos com maior número de ninhos e acompanhamento de longo prazo são necessários para avaliar essas possíveis associações.

Conclusão

Os resultados demonstraram que Fluvicola nengeta incorpora materiais naturais, de origem natural e antropogênicos às estruturas de nidificação em ambientes urbanos e periurbanos do campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Apesar da incorporação recorrente dos resíduos, os materiais naturais permaneceram como o principal componente dos ninhos. Materiais naturais como gravetos e antropogênicos como barbantes e linhas, concentraram-se na porção externa dos ninhos, enquanto penas, papéis e plásticos, apresentaram maior participação na região interna, sugerindo que há um padrão de organização diferencial dos materiais.

Assim, o presente estudo contribui para o conhecimento sobre a utilização de recursos naturais e antropogênicos por F. nengeta em áreas urbanas e evidencia a importância de investigar os efeitos da urbanização sobre a composição dos ninhos e comportamento reprodutivo de aves sinantrópicas.

Por fim, embora os resultados demonstrem que F. nengeta incorpora regularmente materiais antropogênicos à construção dos ninhos, os efeitos dessa prática sobre o sucesso reprodutivo da espécie ainda permanecem pouco compreendidos. Dessa forma, recomenda-se a realização de estudos de longo prazo que integrem o monitoramento da composição dos ninhos com parâmetros reprodutivos, como sucesso de eclosão, sobrevivência dos filhotes e ocorrência de lesões associadas aos diferentes tipos de resíduos incorporados. Tais estudos poderão esclarecer se a utilização desses materiais na nidificação acarretam em consequências para a reprodução e a dinâmica populacional da espécie, contribuindo para a conservação desta e de outras aves que utilizam ambientes antropizados.

Referências

AZEVEDO-SANTOS, V. M. et al. Plastic use by a Brazilian freshwater bird species in its nesting activities. Water Biology and Security, v. 1, 100065, 2022. DOI: 10.1016/j.watbs.2022.100065.

BATTISTI, C. et al. Interactions between anthropogenic litter and birds: a global review with a 'black-list' of species. Marine Pollution Bulletin, v. 138, p. 93-114, 2019. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.11.017.

BIDDLE, L. E.; DEEMING, D. C.; GOODMAN, A. M. Morphology and biomechanics of the nests of the Common Blackbird Turdus merula. Bird Study, v. 62, n. 1, p. 87-95, 2015. DOI: 10.1080/00063657.2014.988119.

BIDDLE, L. E.; GOODMAN, A. M.; DEEMING, D. C. Construction patterns of birds' nests provide insight into nest-building behaviours. PeerJ, v. 5, e3010, 2017. DOI: 10.7717/peerj.3010.

BLETTLER, M. C. M.; MITCHELL, C. Dangerous traps: macroplastic encounters affecting freshwater and terrestrial wildlife. Science of the Total Environment, v. 798, 149317, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149317.

BOND, A. L. et al. Prevalence and composition of fishing gear debris in the nests of northern gannets (Morus bassanus) are related to fishing effort. Marine Pollution Bulletin, v. 64, p. 907-911, 2012. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.03.011.

BORGES, F. J. A.; MARINI, M. Â. Birds nesting survival in disturbed and protected Neotropical savannas. Biodiversity and Conservation, v. 19, n. 1, p. 223-236, 2010.

FERNANDES, V. M.; TOMAZ, V. C.; ALVES, M. A. S. Reprodução da lavadeira-mascarada Fluvicola nengeta (Aves: Tyrannidae) em área urbana no Rio de Janeiro, RJ. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu, MG. Anais [...]. Caxambu, MG, 2007.

GREGORY, R. D.; VAN STRIEN, A. Wild bird indicators: using composite population trends of birds as measures of environmental health. Ornithological Science, v. 9, n. 1, p. 3-22, 2010. DOI: 10.2326/osj.9.3.

HANSELL, M. Bird nests and construction behaviour. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

JAGIELLO, Z.; DYLEWSKI, Ł.; TOBOLKA, M.; AGUIRRE, J. I. Life in a polluted world: a global review of anthropogenic materials in bird nests. Environmental Pollution, v. 251, p. 717-722, 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.028.

JAGIELLO, Z. et al. The extended avian urban phenotype: anthropogenic solid waste pollution, nest design, and fitness. Science of the Total Environment, v. 838, 156034, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156034.

LOPES, L. E.; PEIXOTO, H. J. C.; HOFFMANN, D. Notas sobre a biologia reprodutiva de aves brasileiras. Atualidades Ornitológicas On-line, n. 171, p. 33-49, jan./fev. 2013.

MAIA, C. S. R. Biologia reprodutiva e comportamento alimentar de Fluvicola nengeta (Linnaeus, 1766) (Aves: Tyrannidae). 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2013. Disponível em: Repositório da UFES. Acesso em: 7 ago. 2026.

MAINWARING, M. C. et al. Adaptive latitudinal variation in common blackbird Turdus merula nest characteristics. Ecology and Evolution, v. 4, n. 6, p. 841-851, 2014. DOI: 10.1002/ece3.952.

MANSFIELD, I. et al. Birds as bioindicators of plastic pollution in terrestrial and freshwater environments: a 30-year review. Environmental Pollution, 2024. DOI: 10.1016/j.envpol.2024.123790.

MARINI, M. Â.; DUCA, C.; MANICA, L. T. Técnicas de pesquisa em biologia reprodutiva de aves. In: ORNITOLOGIA e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 295-312.

MARTIN, T. E.; GEUPEL, G. R. Nest-monitoring plots: methods for locating nests and monitoring success. Journal of Field Ornithology, v. 64, p. 507-519, 1993.

MEDEIROS, P. I. S.; CARVALHO, A. R. Conhecendo a Mata dos Saguis. La.Na. Mata dos Saguis, 2017. Disponível em:https://florestinhaufrn.wixsite.com/lanamatadossaguis/a-mata-dos-saguis.

NATAL. Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo (SEMURB). Natal: geografia e meio ambiente. Natal: Prefeitura Municipal do Natal, Secretaria Adjunta de Gestão Ambiental, Departamento de Ação Socioambiental, Setor de Educação Ambiental, 2010.

PACHECO, S.; SIMON, J. E. Variações no padrão de nidificação de Fluvicola nengeta Linnaeus, 1766 (Aves, Tyrannidae). Revista Brasileira de Biologia, v. 55, n. 4, p. 609-615, 1995.

ROY, J.; DOMINONI, D. Urbanization affects nest material composition and use of anthropogenic materials in blue tit nests. bioRxiv, 2024. DOI: 10.1101/2024.04.25.591121.

SANTOS, R. G. et al. Plastic ingestion as an evolutionary trap: toward a holistic understanding. Science, v. 373, n. 6550, p. 56-60, 2021. DOI: 10.1126/science.abh0945.

SICK, H. Ornitologia brasileira: uma introdução. Brasília, DF: Editora Universidade de Brasília, 1985. 2 v.

SILVA, T. L. et al. Comparison of breeding biology aspects of Fluvicola nengeta (Aves: Tyrannidae) between two nesting sites. Journal of Natural History, v. 52, p. 225-235, 2018a.

SILVA, T. L. et al. Observations on parental care of the Masked Water-Tyrant (Fluvicola nengeta) in Rio de Janeiro, Brazil. Ornitologia Neotropical, v. 29, p. 343-348, 2018b. Disponível em:https://journals.sfu.ca/ornneo/index.php/ornneo/article/view/291.

SUÁREZ-RODRÍGUEZ, M.; MACÍAS GARCIA, C. There is no such a thing as a free cigarette; lining nests with discarded butts brings short-term benefits, but causes toxic damage. Journal of Evolutionary Biology, v. 27, n. 12, p. 2719-2726, 2014. DOI: 10.1111/jeb.12531.

THOMPSON, R. C. et al. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 364, p. 2153-2166, 2009. DOI: 10.1098/rstb.2009.0053.

TOMAZ, V. C. et al. Reprodução de Fluvicola nengeta (Tyrannidae) em área urbana da cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Revista Brasileira de Ornitologia, v. 17, p. 70-72, 2009.

TOWNSEND, A. K.; BARKER, C. M. Plastic and the nest entanglement of urban and agricultural crows. PLoS ONE, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0088006.

Anexos



Figura 1: Localização da área de estudo, correspondente ao campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), no município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.



Figura 2: Observação de ninho de Fluvicola nengeta utilizando câmera endoscópica com o auxílio de hastes metálicas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, campus Natal, em 02 de julho de 2026.



Figura 3: Localização dos ninhos de Fluvicola nengeta monitorados no período de novembro de 2025 á julho de 2026, no campus Natal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.



Figura 4: Ninhos de Fluvicola nengeta que foram coletados após sua desativação e posteriormente dissecados para identificação e quantificação dos materiais constituintes. (A) Ninho 1; (B) Ninho 2; (C) Ninho 3 durante a fase de construção, antes de sua des



Tabela 1: Dimensões da entrada dos ninhos de Fluvicola nengeta coletados no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte após o término da atividade reprodutiva.



Figura 5: Massa inicial (g) dos ninhos de Fluvicola nengeta antes da dissecação, coletados no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.



Figura 6: Ninho N1 de Fluvicola nengeta em diferentes vistas: (A) frontal; (B) lateral; (C) superior, coletado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte em 25 de fevereiro de 2026.



Figura 7: Massa (g) das categorias de materiais obtidas após a dissecação do ninho N1 de Fluvicola nengeta.



Figura 8: Massa (g) de cada tipo de material identificado após a dissecação do ninho N1 de Fluvicola nengeta.



Figura 9: Materiais antropogênicos identificados após a dissecação do ninho N1 de Fluvicola nengeta: (A) grampo metálico; (B) fibra plástica com mais de 30 cm de comprimento.



Figura 10: Ninho N2 de Fluvicola nengeta em vista superior, coletado no campus central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em 25 de fevereiro de 2026.



Figura 11: Massa (g) das categorias de materiais obtidas após a dissecação do ninho N2 de Fluvicola nengeta.



Figura 12: Massa (g) de cada tipo de material identificado após a dissecação do ninho N2 de Fluvicola nengeta.



Figura 13: Fibras sintéticas identificadas após a dissecação do ninho N2 de Fluvicola nengeta: (A) cerda de vassoura; (B) fibra plástica.



Figura 14: Fotografia ampliada de penas de outras espécies identificadas entre os materiais constituintes do ninho N2 de Fluvicola nengeta: (A) pena de Thraupis sayaca; (B) pena de Thraupis palmarum.



Figura 15: Ninho N3 de Fluvicola nengeta em diferentes vistas: (A) frontal; (B) lateral; coletado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte em 10 de abril de 2026.



Figura 16: Massa (g) das categorias de materiais obtidas após a dissecação do ninho N3 de Fluvicola nengeta.



Figura 17: Massa (g) de cada tipo de material identificado após a dissecação do ninho N3 de Fluvicola nengeta.



Figura 18: Fragmento de barbante com 179 cm de comprimento encontrado no ninho N3 de Fluvicola nengeta: (A) fotografia aproximada; (B) fotografia completa.



Figura 19: Fibra sintética azul-vibrante identificada entre os materiais constituintes do ninho N3 de Fluvicola nengeta.



Figura 20: Pena de Athene cunicularia utilizada na composição do ninho N3 de Fluvicola nengeta.

CÓDIGO: SB0965

AUTOR: BIANCA LINO RIBEIRO DANTAS

ORIENTADOR: EDILSON DANTAS DA SILVA JUNIOR

TÍTULO: Avaliação bioquântica das interações entre ligantes serotoninérgicos e o receptor 5-HT1A

Resumo

A serotonina (5-HT) e compostos psicoativos, como DMT, 5-MeO-DMT e 8-OH-DPAT, atuam sobre o receptor 5-HT1A, importante alvo em transtornos neuropsiquiátricos. Entretanto, os determinantes estruturais do reconhecimento molecular desses ligantes ainda não são totalmente compreendidos. Este estudo realizou uma análise bioquântica comparativa dos complexos 5-HT/5-HT1A e 5-MeO-DMT/5-HT1A, visando identificar resíduos essenciais para sua estabilização. As estruturas do Protein Data Bank (7E2Y e 9KVG) foram preparadas e otimizadas no Discovery Studio, com estados de protonação definidos em pH fisiológico utilizando MarvinSketch e PROPKA. As energias de interação foram calculadas por Teoria do Funcional da Densidade (DFT), empregando o funcional B97D e o modelo CPCM ($\varepsilon = 40$). A contribuição energética dos resíduos foi determinada pelo método Molecular Fragmentation with Conjugate Caps (MFCC). A energia total de interação foi de $-36{,}65$ kcal·mol^{-1} para 5-MeO-DMT e $-34{,}27$ kcal·mol^{-1} para serotonina. ASP116 destacou-se como principal contribuinte energético, enquanto ASP116, VAL117, PHE361, PHE362 e THR200 formaram um núcleo conservado de interação. Resíduos específicos, como CYS119 e ASN386, contribuíram para a estabilização dos complexos com serotonina e 5-MeO-DMT, respectivamente. Os resultados elucidam determinantes moleculares do reconhecimento no 5-HT1A e podem contribuir para o planejamento racional de novos fármacos serotoninérgicos.

Palavras-chave: Receptor 5-HT1A; DFT; Agonistas serotoninérgicos; Análise bioquântica

TITLE: Biochemical Quantum Assessment of the Interactions Between Serotonergic Ligands and the 5-HT1A Receptor

Abstract

Serotonin (5-HT) and psychoactive compounds, including DMT, 5-MeO-DMT, and 8-OH-DPAT, act through the 5-HT1A receptor, an important target in neuropsychiatric disorders. However, the structural determinants of ligand recognition remain incompletely understood. This study performed a comparative bioquantum analysis of

5-HT/5-HT1A and 5-MeO-DMT/5-HT1A complexes to identify residues involved in their stabilization. Protein Data Bank structures (7E2Y and 9KVG) were prepared and optimized using Discovery Studio, with protonation states assigned at physiological pH using MarvinSketch and PROPKA. Interaction energies were calculated using Density Functional Theory (DFT), employing the B97D functional and CPCM solvation model (ε = 40). Individual residue contributions were determined using Molecular Fragmentation with Conjugate Caps (MFCC). Total interaction energies were −36.65 kcal·mol⁻¹ for 5-MeO-DMT and −34.27 kcal·mol⁻¹ for serotonin. A conserved interaction core involving ASP116, VAL117, PHE361, PHE362, and THR200 was identified in both systems. ASP116 was the major energetic contributor, highlighting its central role in ligand anchoring. Ligand-specific interactions involving CYS119 for serotonin and ASN386 for 5-MeO-DMT were also identified. These findings clarify the molecular determinants of ligand recognition at 5-HT1A and support the rational design of novel serotonergic drugs.

Keywords: 5-HT1A receptor; DFT; Serotonergic agonists; Bioquantum analysis

Introdução

A serotonina (5-HT) é uma monoamina derivada do aminoácido essencial L-triptofano que desempenha um papel central na regulação do humor, cognição, comportamento, ciclo sono-vigília e apetite (JONES et al., 2020). A regulação de sua biodisponibilidade é estritamente controlada: a etapa limitante da síntese consiste na conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), que possui as isoformas TPH1 (periférica) e TPH2 (central) (CHEN; MILLER, 2012). O 5-HTP é subsequentemente descarboxilado a 5-HT pela L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC). No sistema nervoso central, a síntese ocorre principalmente nos Núcleos da Rafe — destacando-se o Núcleo Dorsal (DRN) e o Núcleo Mediano (MRN) —, de onde os neurônios serotoninérgicos inervam o córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e hipotálamo (RAMOS, 2021; REN et al., 2018). Após a síntese, a serotonina é empacotada em vesículas pré-sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), protegendo-a da degradação metabólica pela monoamina oxidase (MAO-A) e evitando o estresse oxidativo por acúmulo extracelular (WANG et al., 2024). Quando liberada na fenda sináptica sob influxo de Ca^{2+}, a 5-HT atua em diversas famílias de receptores. Dentre os 14 receptores identificados, o receptor 5-HT1A, acoplado à proteína G e amplamente distribuído em regiões como amígdala e hipocampo (GÖTHERT et al., 2020), destaca-se pela sua atuação tanto pós-sináptica quanto pré-sináptica (como autorreceptor), regulando a própria taxa de disparo e liberação de 5-HT (YOHN et al., 2017). Além de sua importância na neuroplasticidade e no neurodesenvolvimento (STIEDL et al., 2015), o 5-HT1A é um dos principais alvos terapêuticos em transtornos como ansiedade e depressão maior (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2023). Estudos de modelagem computacional e bioquântica têm se tornado essenciais para elucidar as bases moleculares da interação com esse receptor. Investigações com o ligante endógeno revelam que interações com resíduos como D3.32 (atração) e T3.37/Y7.43 (repulsão) modulam a seletividade conformacional do 5-HT1A (ŚLIWA et al., 2019). Além da serotonina, compostos psicoativos e análogos sintéticos, como o 5-MeO-DMT, a DMT e o agonista seletivo 8-OH-DPAT, apresentam elevada afinidade pelo 5-HT1A, atuando como agonistas funcionais capazes de inibir a adenilato ciclase e alterar o estado conformacional da proteína (CUMMING et al., 2021;

ZHAO et al., 2024). Entretanto, apesar da caracterização individual desses ligantes, os mecanismos energéticos e estruturais comparativos envolvidos no reconhecimento molecular do 5-HT1A ainda não foram completamente elucidados. O mapeamento conjunto dessas interações é fundamental para identificar o núcleo conservado de atração e os resíduos específicos responsáveis por perfis de ligação distintos, auxiliando na dissociação entre efeitos terapêuticos e psicodélicos. Diante disso, este estudo teve como objetivo realizar uma análise bioquântica comparativa das interações no sítio ortostérico do receptor 5-HT1A complexado com serotonina e 5-MeO-DMT, determinando os principais resíduos de aminoácidos responsáveis pela estabilização e seletividade de cada sistema.

Metodologia

Obtenção e seleção das estruturas: As estruturas tridimensionais dos complexos envolvendo o receptor humano 5-hidroxitriptamina 1A (5-HT1A) foram obtidas no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB-PDB). Foram selecionadas as estruturas do receptor 5-HT1A acoplado à proteína Gi em complexo com os ligantes serotonina (PDB ID: 7E2Y) e 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT; PDB ID: 9KVG). Para as etapas subsequentes, foi selecionada a cadeia correspondente ao monômero R, considerando sua melhor definição estrutural e o menor número de falhas estruturais decorrentes do processo de determinação por crio-microscopia eletrônica. A utilização das estruturas experimentais permitiu a análise comparativa das interações entre o receptor 5-HT1A e ligantes com diferentes características químicas e farmacológicas. Preparação, otimização e protonação dos sistemas: As estruturas selecionadas foram submetidas a procedimentos de preparação estrutural utilizando o software Discovery Studio, versão 3.1. Inicialmente, foram realizadas a correção de inconsistências estruturais, a adição de cadeias laterais ausentes e a inclusão dos átomos de hidrogênio não resolvidos experimentalmente. Posteriormente, foi realizada a otimização geométrica dos átomos de hidrogênio por meio do campo de força CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics), visando à obtenção de modelos estruturalmente consistentes e energeticamente adequados para os cálculos computacionais. Os estados de protonação dos ligantes foram determinados utilizando o software MarvinSketch, enquanto os estados de protonação dos resíduos aminoacídicos do receptor foram avaliados por meio da ferramenta PROPKA, versão 3.1. Os sistemas foram preparados considerando condições próximas ao pH fisiológico, de modo a representar de forma mais adequada o ambiente molecular no qual ocorrem as interações receptor-ligante. Seleção dos resíduos e fragmentação molecular: Para a identificação dos resíduos potencialmente envolvidos nas interações com os ligantes, foi estabelecido inicialmente um raio de 2 Å ao redor de cada molécula. O raio de seleção foi progressivamente ampliado em incrementos de 0,5 Å, até que a variação da energia de interação entre duas etapas consecutivas fosse inferior a 10%. Esse procedimento permitiu definir um conjunto de resíduos estruturalmente relevantes para a caracterização das interações entre os ligantes e o sítio de ligação do receptor. A análise das interações foi realizada utilizando o Método de Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (Molecular Fractionation with Conjugate Caps – MFCC). Nesse método, a estrutura proteica foi fragmentada em resíduos individuais de aminoácidos, permitindo o cálculo das contribuições energéticas de cada resíduo para a interação com o ligante. Para preservar as valências químicas resultantes da fragmentação da cadeia polipeptídica, os resíduos

imediatamente anterior e posterior ao aminoácido de interesse foram utilizados como capas (caps), com a adição de átomos de hidrogênio nas extremidades livres. Cálculo das energias de interação: As energias de interação entre cada ligante e os resíduos selecionados do receptor 5-HT$_1$A foram calculadas utilizando o software Gaussian 09, com base na Teoria do Funcional da Densidade (Density Functional Theory – DFT). Foi empregado o funcional B97D, que inclui correções para interações de dispersão, sendo adequado para a investigação de interações não covalentes relevantes em sistemas biomoleculares. Para representar os efeitos do ambiente molecular sobre as interações, foi utilizado o modelo de solvatação contínua CPCM (Continuous Polarizable Continuum Model), adotando-se uma constante dielétrica de $\varepsilon = 40$. A energia de interação entre o ligante e cada resíduo foi determinada pela abordagem MFCC, considerando as energias dos diferentes subsistemas formados pelo ligante, pelo resíduo de interesse e pelas capas adjacentes. Dessa forma, as contribuições energéticas individuais foram obtidas pela combinação das energias dos subsistemas, permitindo isolar a interação específica entre cada resíduo aminoacídico e o respectivo ligante. Por fim, as energias individuais obtidas para os resíduos selecionados foram analisadas comparativamente entre os quatro complexos estudados, permitindo identificar os principais resíduos envolvidos na estabilização das interações e caracterizar o perfil energético de ligação da serotonina e 5-MeO-DMT ao receptor 5-HT1A.

Resultados e Discussões

Os ligantes avaliados até o presente momento apresentaram diferentes perfis de energia de interação com o receptor 5-HT1A. As energias totais de interação, em ordem decrescente de intensidade, foram: 5-MeO-DMT (−36,65 kcal·mol^{-1}) > serotonina (−34,27 kcal·mol^{-1}). Para avaliar a influência dos resíduos presentes no sítio de ligação sobre a energia total dos complexos, foi realizada a análise de convergência, considerando os resíduos localizados em um raio de até 10 Å do ligante. A análise de convergência permitiu determinar a distância a partir da qual as contribuições energéticas dos resíduos adicionais passaram a exercer influência pouco significativa sobre a energia total do sistema. Os gráficos de convergência dos complexos avaliados são apresentados nas Figuras 1 e 2, correspondentes à serotonina, agonista endógeno, e ao 5-MeO-DMT, agonista não seletivo, respectivamente. Ambos os complexos atingiram a convergência no raio de 3.5 Å. Figura 1. Gráfico de convergência da serotonina. Figura 2. Gráfico de convergência do 5-Meo-DMT. Para facilitar a descrição e a compreensão das características estruturais dos ligantes avaliados, as moléculas de serotonina (5-HT) e 5-MeO-DMT foram subdivididas visualmente em duas regiões distintas (Figura 3). Em ambos os ligantes, a Região I corresponde à cadeia lateral etilamínica, enquanto a Região II compreende o núcleo indólico. Essa divisão permite avaliar de forma mais sistemática a contribuição de diferentes porções estruturais dos ligantes para as interações estabelecidas com o receptor 5-HT1A. Figura 3. Divisão estrutural dos ligantes serotonina (5-HT) e 5-Meo-DMT em regiões para análise das interações com o receptor 5-HT1A. No complexo 5-HT/5-HT1A, os resíduos que apresentaram as maiores contribuições atrativas, conforme demonstrado na Figura 4, foram ASP116 (−11,41 kcal·mol^{-1}), PHE361 (−3,83 kcal·mol^{-1}), VAL117 (−3,75 kcal·mol^{-1}), PHE362 (−2,69 kcal·mol^{-1}), THR390 (−1,43 kcal·mol^{-1}), THR121 (−1,41 kcal·mol^{-1}), THR200 (−1,41 kcal·mol^{-1}), ILE129 (−1,29 kcal·mol^{-1}) e ALA203 (−1,21 kcal·mol^{-1}). Figura 4. Painel gráfico com os valores energéticos dos principais resíduos envolvidos na interação Serotonina (5-HT)/5-HT1A. Entre esses resíduos, o ASP116

apresentou a maior contribuição energética, destacando-se como o principal contribuinte para a estabilização do complexo, devido à formação de uma ponte salina com o grupamento amina carregado positivamente do ligante. Por outro lado, CYS119 (+0,64 kcal·mol⁻¹), LYS191 (+0,50 kcal·mol⁻¹) e SER199 (+0,49 kcal·mol⁻¹) apresentaram contribuições energéticas positivas, indicando a ocorrência de interações de caráter repulsivo. No complexo 5-MeO-DMT/5-HT1A, os resíduos com maiores contribuições energéticas, conforme demonstrado na Figura 5, foram ASP116 (−7,52) > VAL117 (−5,60) > PHE361 (−3,52) > PHE362 (−2,91) > CYS120 (−2,38) > ILE189 (−2,15) > THR200 (−1,81) > TRP358 (−1,59), enquanto SER199 (+0,49) e ASN386 (+0,91) apresentaram contribuições positivas. Figura 5. Painel gráfico com os valores energéticos dos principais resíduos envolvidos na interação 5-meo-DMT+5HT1A. Entre esses resíduos, o ASP116 também apresentou a maior contribuição energética, destacando-se como o principal contribuinte para a estabilização do complexo, devido à formação de uma ponte salina com o grupamento amina carregado positivamente do ligante. Por outro lado, ASN386 (+0,91 kcal·mol⁻¹) e SER199 (+0,49 kcal·mol⁻¹) apresentaram contribuições energéticas positivas, indicando a ocorrência de interações de caráter repulsivo. A análise comparativa revelou um núcleo conservado de interação constituído pelos resíduos ASP116, VAL117, PHE361, PHE362 e THR200, identificados entre os principais contribuintes energéticos dos dois complexos avaliados. O ASP116 destacou-se como o principal contribuinte energético em todos os sistemas, apresentando valores de −11,41 kcal·mol⁻¹ para serotonina e −7,52 kcal·mol⁻¹ para 5-MeO-DMT. Esses resultados reforçam a importância desse resíduo no reconhecimento e na estabilização dos diferentes ligantes ao sítio ortostérico do receptor 5-HT1A. Além do núcleo conservado, foram observados padrões de interação compartilhados entre os ligantes analisados. O resíduo SER199 esteve presente entre os principais contribuintes dos complexos serotonina/5-HT1A e 5-MeO-DMT/5-HT1A. Em contrapartida, alguns resíduos foram identificados exclusivamente entre os principais contribuintes de determinados ligantes. CYS119 e ILE129 foram observados no complexo serotonina/5-HT1A, enquanto ASN386 foi identificado no complexo 5-MeO-DMT/5-HT1A. Essas diferenças demonstram que, embora os agonistas compartilhem um conjunto central de resíduos envolvidos na estabilização dos complexos, as características estruturais específicas de cada ligante podem favorecer diferentes padrões de interação com determinados resíduos do receptor.

Conclusão

A análise dos complexos serotonina/5-HT1A e 5-MeO-DMT/5-HT1A permitiu caracterizar o perfil energético das interações estabelecidas entre os ligantes e o receptor, destacando a participação central de resíduos como ASP116, VAL117, PHE361 e PHE362 na estabilização dos complexos. A caracterização desses resíduos contribui para uma melhor compreensão dos fatores moleculares envolvidos no reconhecimento e na acomodação da serotonina e do 5-MeO-DMT no receptor 5-HT1A. Além disso, esses achados podem auxiliar na identificação de regiões relevantes para a interação ligante-receptor, fornecendo informações que poderão ser utilizadas em estudos futuros de modelagem molecular e no planejamento racional de novos compostos com potencial farmacológico direcionados ao sistema serotoninérgico.

Referências

BEZERRA, Katyanna S.; FULCO, Umberto L.; ESMAILE, Stephany C.; LIMA NETO, José X.; MACHADO, Leonardo D.; FREIRE, Valder N.; ALBUQUERQUE, Eudenilson L.; OLIVEIRA, Jonas I. N. Ribosomal RNA–Aminoglycoside Hygromycin B Interaction Energy Calculation within a Density Functional Theory Framework. The Journal of Physical Chemistry B, v. 123, n. 30, p. 6421–6429, 8 jul. 2019. American Chemical Society (ACS). CALDARARU, Octav; MANZONI, Francesco; OKSANEN, Esko; LOGAN, Derek T.; RYDE, Ulf. Refinement of protein structures using a combination of quantum-mechanical calculations with neutron and X-ray crystallographic data. Acta Crystallographica Section D Structural Biology, v. 75, n. 4, p. 368–380, 28 mar. 2019. International Union of Crystallography (IUCr). CHEN, G. L.; MILLER, G. M. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin–stress interaction and clinical implications. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, v. 159B, n. 2, p. 152–171, 2012. DOI: https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32023. CUMMING, P.; SCHEIDEGGER, M.; DORNBIERER, D.; PALNER, M.; QUEDNOW, B. B.; MARTIN-SOELCH, C. Molecular and functional imaging studies of psychedelic drug action in animals and humans. Molecules, v. 26, n. 9, art. 2451, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules2609245. DANTAS, Diego S.; OLIVEIRA, Jonas I. N.; LIMA NETO, José X.; COSTA, Roner F. da; BEZERRA, Eveline M.; FREIRE, Valder N.; CAETANO, Ewerton W. S.; FULCO, Umberto L.; ALBUQUERQUE, Eudenilson L. Quantum molecular modelling of ibuprofen bound to human serum albumin. RSC Advances, v. 5, n. 61, p. 49439–49450, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09. Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009. GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S.; SOLER, J.; NUÑEZ, E.; et al. The serotonergic system in anxiety and depression: recent insights and therapeutic implications. Frontiers in Synaptic Neuroscience, v. 12, art. 25, 2023. DOI: 10.3389/fnsyn.2023.1124112 GORDON, Mark S. et al. Fragmentation methods: A route to accurate calculations on large systems. Chemical Reviews, v. 112, n. 1, p. 632–672, 2012. GÖTHERT, M.; BÖNISCH, H.; MALINOWSKA, B. et al. Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part II. Some contributions of Manfred Göthert. Pharmacological Reports, v. 72, p. 271–284, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s43440-019-00047-4. GRIMME, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. Journal of Computational Chemistry, v. 27, p. 1787–1799, 2006. HE, Xiao; ZHU, Tong; WANG, Xianwei; LIU, Jinfeng; ZHANG, John Z. H. Fragment Quantum Mechanical Calculation of Proteins and Its Applications. Accounts of Chemical Research, v. 47, n. 9, p. 2748–2757, 22 maio 2014. American Chemical Society (ACS). JONES, L. A.; SUN, E. W.; MARTIN, A. M.; KEATING, D. J. The ever-changing roles of serotonin. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 125, p. 105776, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776. LIMA NETO, José X.; SOARES-RACHETTI, Vanessa P.; ALBUQUERQUE, Eudenilson L.; MANZONI, Vinicius; FULCO, Umberto L. Outlining migrainous through dihydroergotamine–serotonin receptor interactions using quantum biochemistry. New Journal of Chemistry, v. 42, n. 4, p. 2401–2412, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). MOMANY, F. A.; RONE, R. Validation of the general purpose QUANTA®3.2/CHARMm® force field. Journal of Computational Chemistry, v. 13, p. 888–900, 1992. OURIQUE, G. S.; VIANNA, J. F.; LIMA NETO, J. X.; OLIVEIRA, J. I. N.; MAURIZ, P. W.; VASCONCELOS, M. S.; CAETANO, E. W. S.; FREIRE, V. N.; ALBUQUERQUE, E. L.; FULCO, U. L. A quantum chemistry investigation of a potential inhibitory drug against the dengue virus.

RSC Advances, v. 6, n. 61, p. 56562–56570, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). PEARSON, T. S.; GUPTA, N.; SAN SEBASTIAN, W. et al. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by MR-guided direct delivery of AAV2-AADC to midbrain dopaminergic neurons. Nature Communications, v. 12, art. 4251, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-021-24524-8. RAMOS, Daniele Cristina. Estudo do papel dos núcleos da rafe nos comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansiosos e na memória de curta duração no modelo animal da doença de Parkinson induzido por rotenona. 2021. Dissertação (Mestrado em [especificar área: ex. Neurociência ou Fisiologia]) – Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021. REN, J. et al. Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus. eLife, v. 7, e49424, 2018 ŚLIWA, P.; KURCZAB, R.; KAFEL, R. et al. Recognition of repulsive and attractive regions of selected serotonin receptor binding site using FMO-EDA approach. Journal of Molecular Modeling, v. 25, art. 114, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s00894-019-3995-6 STIEDL, O.; PAPPA, E.; KONRADSSON-GEUKEN, Å.; ÖGREN, S. O. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. Frontiers in Pharmacology, v. 6, art. 162, 2015. DOI: 10.3389/fphar.2015.001. WANG, Y.; ZHANG, P.; CHAO, Y. et al. Transport and inhibition mechanism for VMAT2-mediated synaptic vesicle loading of monoamines. Cell Research, v. 34, p. 47–57, 2024. DOI: https://doi.org/10.1038/s41422-023-00906-z. WARREN, A. L.; LANKRI, D.; CUNNINGHAM, M. J.; SERRANO, I. C.; PARISE, L. F.; KRUEGEL, A. C.; DUGGAN, P.; ZILBERG, G.; CAPPER, M. J.; HAVEL, V.; RUSSO, S. J.; SAMES, D.; WACKER, D. Structural pharmacology and therapeutic potential of 5-methoxytryptamines. Nature, v. 630, p. 237–246, 2024. DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-024-07403-2. YOHN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression. Molecular Brain, v. 10, p. 28, 2017. DOI: https://doi.org/10.1186/s13041-017-0306-y. ZHAO, X.; LIU, Y.; WANG, Z. et al. Structure–activity relationships of serotonergic 5-MeO-DMT derivatives. Neuropsychopharmacology, v. 49, p. 123–135, 2024. DOI: 10.1038/s41380-024-02506-8.

Anexos



Figura 1. Gráfico de convergência da serotonina.



Figura 2. Gráfico de convergência do 5-Meo-DMT.



Figura 3. Divisão estrutural dos ligantes serotonina (5-HT) e 5-Meo-DMT em regiões para análise das interações com o receptor 5-HT1A.



Figura 4. Painel gráfico com os valores energéticos dos principais resíduos envolvidos na interação Serotonina (5-HT)/5-HT1A.



Figura 5. Painel gráfico com os valores energéticos dos principais resíduos envolvidos na interação 5-meo-DMT+5HT1A.

CÓDIGO: SB0984

AUTOR: ANNA LETICIA BARROS QUEIROZ

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: Características clínicas, antropométricas e metabólicas da lipodistrofia parcial familiar tipo 1 (síndrome de Köbberling) em mulheres: revisão sistemática

Resumo

Introdução: A lipodistrofia parcial familiar tipo 1 (LPF1), ou síndrome de Köbberling, é subtipo raro de lipodistrofia, caracterizado por perda de tecido adiposo em membros associada a acúmulo central, frequentemente subdiagnosticado em mulheres. Objetivo: Sintetizar as evidências disponíveis sobre as características clínicas, antropométricas, metabólicas, hepáticas, cardiovasculares e reprodutivas da LPF1 em mulheres. Métodos: Revisão sistemática de relatos de caso, séries de casos, estudos observacionais e ensaios clínicos, conforme PRISMA 2020. As buscas em PubMed e LILACS resultaram em 822 registros, dos quais 179 foram selecionados para leitura na íntegra após triagem por título e resumo. Resultados esperados: Espera-se consolidar o perfil fenotípico e metabólico das mulheres com LPF1, evidenciando elevada prevalência de resistência insulínica, diabetes, dislipidemia, esteatose hepática e complicações cardiovasculares. Conclusão: A revisão poderá contribuir para o reconhecimento precoce da LPF1 e para a redução do subdiagnóstico da condição.

Palavras-chave: Lipodistrofia; Síndrome de Köbberling; Mulheres; Revisão sistemática

TITLE: Clinical, Anthropometric, and Metabolic Characteristics of Familial Partial Lipodystrophy Type 1 (Köbberling Syndrome) in Women: A Systematic Review

Abstract

Introduction: Familial partial lipodystrophy type 1 (FPLD1), also known as Köbberling syndrome, is a rare subtype of lipodystrophy characterized by loss of adipose tissue in the limbs associated with central fat accumulation and is frequently underdiagnosed in women. Objective: To synthesize the available evidence on the clinical, anthropometric, metabolic, hepatic, cardiovascular, and reproductive characteristics of FPLD1 in women. Methods: A systematic review of case reports, case series, observational studies, and clinical trials was conducted in accordance with PRISMA 2020 guidelines. Searches in PubMed and LILACS identified 822 records, of which 179 were selected for full-text assessment after title and abstract screening. Expected Results: The review is expected to consolidate the phenotypic and metabolic profile of women with FPLD1,

highlighting the high prevalence of insulin resistance, diabetes, dyslipidemia, hepatic steatosis, and cardiovascular complications. Conclusion: This review may contribute to the early recognition of FPLD1 and help reduce the underdiagnosis of the condition.

Keywords: Lipodystrophy; Köbberling Syndrome; Women; Systematic Review

Introdução

O tecido adiposo (TA) é um órgão metabolicamente ativo, responsável por armazenar energia na forma de lipídios. Ademais, desempenha um papel fundamental no sistema endócrino, produzindo e secretando hormônios conhecidos como adipocinas, além de ser um importante reservatório de glicogênio, de modo que participa também da homeostase da glicose. No corpo humano, é possível encontrar TA subcutâneo, abaixo da pele, e TA visceral, localizado próximo às vísceras. É possível, ainda, de acordo com suas características, classificá-lo em: TA branco - associado ao armazenamento de lipídios -, TA marrom - atua fortemente na termogênese -, e TA bege - a depender da situação, pode se comportar como o TA branco ou como o TA marrom. Sendo assim, considerando a complexidade do TA, distúrbios nesse órgão são capazes de causar doença e gerar repercussões clínicas sistêmicas. (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; HARVEY et al., 2020 ;FONSECA RAPOSO, 2020).

Dentre as doenças causadas pela disfunção do TA, estão as lipodistrofias, um grupo heterogêneo de doenças decorrentes da perda do TA subcutâneo. Nessa perspectiva, pode-se categorizar as lipodistrofias em: localizadas, quando a perda de gordura é pequena e restrita a uma determinada área; parciais, quando a ausência de TA acomete os membros; generalizada, quando a perda está presente por todo o corpo. Além disso, as lipodistrofias também podem ser congênitas ou adquiridas. Tendo em vista a complexa fisiologia do TA, os pacientes com lipodistrofia também podem apresentar: hiperfagia, dislipidemia, resistência insulínica e disfunção reprodutiva. (LIMA et al.,2020; AKINCI et al., 2000).

As lipodistrofias parciais familiares (LPF) representam um grupo raro e heterogêneo de condições genéticas que resultam em perdas parciais de TA subcutâneo nos membros superiores e inferiores, estendendo-se à região glútea Essa redistribuição de gordura é uma característica marcante da doença, geralmente se tornando aparente no final da infância ou logo após a puberdade. Nessa perspectiva, a ausência de TA subcutâneo está comumente associada ao acúmulo de gordura em outros órgãos, como fígado e pâncreas, de modo que pacientes com LPF podem evoluir com complicações como: diabetes mellitus, hipertrigliceridemia, pancreatite, esteatose hepática e outras. (GUIDORIZZI et al., 2024; VIOLA et al., 2023)

Atualmente, são reconhecidos sete subtipos de LPF, sendo que a maioria deles é transmitido como herança autossômica dominante. Dentre esses subtipos, apenas o tipo 1 não possui mecanismo genético bem definido, sugerindo uma possível herança poligênica. A significativa variabilidade genética e fenotípica da LPF torna o diagnóstico desafiador, o que frequentemente leva a um reconhecimento tardio da condição. Esse atraso contribui com o surgimento de comorbidades e complicações na população afetada. Ademais, a falta de critérios diagnósticos bem estabelecidos favorece o subdiagnóstico e dificulta a identificação precoce dos casos. De maneira

geral, as lipodistrofias são doenças raras, com prevalência estimada de 1,3 a 4,7 casos por milhão, todavia, é possível que os dados atuais estejam subestimados justamente em razão do subdiagnóstico. (ZAMMOURI et al., 2021; GUIDORIZZI et al., 2024; VERAS et al., 2024; LOH et al., 2024; BAGIAS et al., 2020).

A LPF1 ou Síndrome de Kobberling é frequentemente subdiagnosticada, especialmente em mulheres. Esse subtipo de LPF caracteriza-se por uma distribuição anormal de gordura, com predomínio central e redução nas extremidades inferiores. Além disso, esse fenótipo está fortemente associado a distúrbios no metabolismo da glicose, mesmo em comparação com outras formas de lipodistrofia, além de haver uma maior prevalência de complicações macrovasculares nesse grupo. Tais achados reforçam a importância do diagnóstico precoce, a fim de reduzir as complicações metabólicas associadas. (GUILLÍN-AMARELLE et al., 2016).

Metodologia

Optou-se por uma revisão sistemática de Relatos de caso, séries de casos, estudos transversais, coortes, caso-controle, ensaios clínicos/estudos de intervenção (desde que reportem dados basais ou por subgrupo de mulheres com LPF1). Esse delineamento foi escolhido por permitir maior rigor metodológico e possibilitar a geração de estatísticas descritivas (médias, medianas e proporções) a partir da consolidação de dados individuais ou agregados de múltiplas publicações.

A pergunta de pesquisa que norteadora do estudo foi: quais são as características clínicas, antropométricas, metabólicas, hepáticas, cardiovasculares e reprodutivas descritas em mulheres com lipodistrofia parcial familiar tipo 1 (síndrome de Köbberling)?

Foram incluídos relatos de caso, séries de casos, estudos transversais, coortes, estudos caso-controle e ensaios clínicos/estudos de intervenção, desde que reportassem dados basais ou por subgrupo de mulheres com LPF1. Foram consideradas elegíveis pacientes do sexo feminino ou estudos com população mista cujos dados femininos pudessem ser extraídos separadamente. O diagnóstico de LPF1/Köbberling deveria ser baseado em fenótipo característico associado à exclusão de mutações associadas a outras lipodistrofias parciais familiares. Também foram incluídos artigos que apresentassem pelo menos um dado clínico, antropométrico, metabólico ou de imagem, reportado de forma individual ou agregada por subgrupo de mulheres. Foram considerados artigos de qualquer idioma, com uso de tradução quando necessário, e sem restrição quanto à data de publicação.

Foram excluídos estudos exclusivamente com pacientes do sexo masculino, estudos sobre outros subtipos de lipodistrofia parcial familiar, como LPF2/Dunnigan, LPF3/PPARG, entre outros, sem dados de LPF1 discriminados separadamente, estudos sobre lipodistrofia adquirida, não familiar/genética, revisões sem casos novos e estudos em animais ou modelos celulares.

Foram selecionadas duas bases de dados para a realização da busca: PubMed e LILACS. A estratégia de busca foi construída em duas camadas: uma camada eletrônica ampla, combinando o termo controlado “familial partial lipodystrophy” a sinônimos livres específicos de Köbberling, como “Kobberling”, “FPLD1” e “lipodystrophy of the extremities”, sem restrição de subtipo; e uma camada de triagem manual, na qual os registros recuperados foram avaliados individualmente para identificação dos casos compatíveis com LPF1. Após a execução das buscas nas duas bases de dados e a remoção das duplicatas, foram obtidos 822 artigos. Em seguida, foi elaborada uma tabela de extração de dados, contemplando variáveis demográficas, antropométricas, metabólicas, hepáticas, cardiovasculares, ginecológicas/reprodutivas e relativas aos critérios e métodos diagnósticos utilizados.

Posteriormente, foi realizada a triagem por título e resumo dos 822 artigos, com auxílio da ferramenta Rayyan, resultando em 179 artigos selecionados para leitura na íntegra. Atualmente, o projeto encontra-se na fase de leitura dos textos completos dos artigos selecionados, com extração simultânea dos dados dos estudos já avaliados como elegíveis para a tabela padronizada de extração.

Os próximos passos compreendem a conclusão da leitura dos textos completos e a definição da lista final de estudos incluídos na revisão, seguida da elaboração do fluxograma PRISMA 2020 com os números definitivos de cada etapa do processo de seleção. Posteriormente, será concluída a extração de dados de todos os estudos incluídos, seguida da síntese e análise descritiva dos dados extraídos, organizados por categoria antropométrica, metabólica, hepática, cardiovascular e ginecológica/reprodutiva. Por fim, será realizada a redação do artigo final.

Resultados e Discussões

Até o presente momento, o processo de triagem por título e resumo foi concluído, com 179 artigos selecionados para leitura na íntegra, etapa atualmente em andamento, concomitante à extração de dados. Considerando o estágio do projeto, apresentam-se a seguir os resultados esperados para cada uma das categorias de desfecho definidas no objetivo do estudo, fundamentados na literatura.

Espera-se que as mulheres com LPF1 apresentem, de forma consistente entre os estudos, um padrão de redistribuição de gordura corporal caracterizado pela perda de tecido adiposo subcutâneo em membros inferiores e região glútea, associada a acúmulo de gordura em região troncular e visceral. Medidas antropométricas, como a relação cintura-quadril e razões entre pregas cutâneas do tronco e das extremidades, devem se mostrar úteis como ferramentas diagnósticas de baixo custo, corroborando achados prévios que apontam essas medidas como indicadores relevantes para a identificação da LPF1 em mulheres (VERAS et al., 2024).

Com relação ao perfil metabólico, espera-se elevada prevalência de alterações, incluindo resistência insulínica, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia (particularmente hipertrigliceridemia). Esses achados devem confirmar o padrão já descrito na literatura, no qual a LPF1 se associa a um perfil metabólico comparável ou até mais grave que o

observado em outros subtipos de lipodistrofia parcial familiar, apesar de uma perda de gordura corporal proporcionalmente menor (GUILLÍN-AMARELLE et al., 2016).

Antecipa-se também prevalência aumentada de complicações macrovasculares nas mulheres com LPF1, incluindo hipertensão arterial e doença arterial coronariana, em consonância com estudos populacionais que relatam maior morbidade e mortalidade cardiovascular entre pacientes com lipodistrofia parcial familiar, com destaque para o subgrupo do tipo 1 (GUIDORIZZI et al., 2024).

Dentre os aspectos ginecológicos e reprodutivos, é esperada uma prevalência aumentada de irregularidade menstrual, síndrome dos ovários policísticos e complicações obstétricas (como diabetes gestacional) nas mulheres com LPF1, refletindo o impacto da resistência insulínica sobre o eixo reprodutivo.

Prevê-se, ainda, uma ampla heterogeneidade entre os estudos quanto aos critérios utilizados para o diagnóstico de LPF1, variando desde o diagnóstico clínico isolado até a combinação de critérios antropométricos padronizados e a exclusão molecular de mutações em LMNA e PPARG. Estudos mais recentes, com desenho de série de casos, têm caracterizado esse subtipo de lipodistrofia como poligênico, reforçando a ausência de um marcador genético causal único validado até o momento (LOH et al., 2024).

Conclusão

O presente projeto encontra-se em fase de leitura de textos completos e extração de dados dos artigos selecionados, etapa que antecede a síntese quantitativa dos achados. Espera-se que a conclusão desta revisão sistemática permita consolidar, de forma inédita, um panorama abrangente das características clínicas, antropométricas, metabólicas, hepáticas, cardiovasculares e reprodutivas da lipodistrofia parcial familiar tipo 1 em mulheres, população na qual a condição é mais frequentemente reconhecida, porém ainda pouco sistematizada na literatura.

Acredita-se que os resultados consolidados possam contribuir para o reconhecimento clínico precoce da LPF1, para a redução do subdiagnóstico associado à ausência de critérios padronizados e para o direcionamento de estratégias de rastreamento e manejo das complicações metabólicas, hepáticas e cardiovasculares nessa população. Adicionalmente, a identificação sistemática de lacunas metodológicas na literatura atual deverá subsidiar a proposição de agendas de pesquisa futuras sobre o tema.

Referências

AKINCI, B.; GULAR, M. C.; ORAL, E. A. Lipodystrophy syndromes: Presentation and treatment. Em: Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

BAGIAS, C. et al. Familial partial lipodystrophy (FPLD): Recent insights. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy, v. 13, p. 1531–1544, 2020.

FONSECA RAPOSO, H. Tecido adiposo: suas cores e versatilidade. HU Revista, v. 46, p. 1–12, 2020.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia, v. 50, n. 2, p. 216–229, 2006.

GUIDORIZZI, N. R. et al. Comprehensive analysis of morbidity and mortality patterns in familial partial lipodystrophy patients: insights from a population study. Frontiers in endocrinology, v. 15, p. 1359211, 2024.

GUILLÍN-AMARELLE, C. et al. Type 1 familial partial lipodystrophy: understanding the Köbberling syndrome. Endocrine, v. 54, n. 2, p. 411–421, 2016.

HARVEY, I.; BOUDREAU, A.; STEPHENS, J. M. Adipose tissue in health and disease. Open biology, v. 10, n. 12, p. 200291, 2020.

LIMA, Josivan Gomes de; CAMPOS, Julliane Tamara Araújo de Melo (org.). Síndrome de Berardinelli-Seip: aspectos genéticos e morfofisiológicos. Natal: EDUFRN, 2020.

LOH, W. J. et al. Clinical and imaging features of women with polygenic partial lipodystrophy: a case series. Nutrition & diabetes, v. 14, n. 1, p. 3, 2024.

VERAS, V. R. et al. Anthropometric measurements as a key diagnostic tool for familial partial lipodystrophy in women. Diabetology & metabolic syndrome, v. 16, n. 1, p. 216, 2024.

VIOLA, L. F. et al. Waist circumference is independently associated with liver steatosis and fibrosis in LMNA-related and unrelated Familial Partial Lipodystrophy women. Diabetology & metabolic syndrome, v. 15, n. 1, p. 182, 2023.

CÓDIGO: SB0988

AUTOR: ANNA LYVIA AZEVEDO CAVALCANTE

COAUTOR: ANA LUIZI BARACHO DA SILVA

COAUTOR: JANINE INEZ ROSSATO

COAUTOR: NINA BEVILAQUA CAMMAROTA

COAUTOR: THAIS PRISCILA LIMA SILVA

COAUTOR: GENEDY KARIELLY DA SILVA APOLINARIO

ORIENTADOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

TÍTULO: Reconsolidação como mecanismo de vínculo entre memórias de objetos

Resumo

A memória declarativa pode ser atualizada e integrada a novas informações por meio do processo de reconsolidação. Este estudo investigou os mecanismos comportamentais pelos quais memórias distintas de reconhecimento de objetos se vinculam. Utilizou-se ratas Wistar adultas submetidas à Tarefa de Reconhecimento de Objeto Novo (TRON) em campo aberto. Inicialmente, determinou-se a janela temporal de persistência da memória, observando-se que os animais perdem a capacidade de discriminar espontaneamente um objeto familiar 360 horas (15 dias) após o treino. Em seguida, para testar o vínculo mnemônico, os animais reativaram a memória de um objeto familiar A juntamente com a apresentação de um objeto novo, C. Quinze dias após essa sessão, período caracterizado pelo esquecimento espontâneo, a apresentação de um breve lembrete contendo apenas o objeto A foi suficiente para os animais recuperarem não só a memória de A, mas também discriminarem o objeto C em testes subsequentes, sem necessidade de reexposição direta prévia a este. Os resultados demonstram que a reconsolidação não atua na atualização de memórias individuais de forma isolada, mas funciona como um mecanismo mediador crítico para a formação e a manutenção de vínculos associativos estáveis entre memórias temporalmente relacionadas.

Palavras-chave: Reconsolidação. Reconhecimento de objetos. Hipocampo. Memória.

TITLE: Reconsolidation as a mechanism linking object memories

Abstract

Declarative memory can be updated and integrated with new information through the process of reconsolidation. This study investigated the behavioral mechanisms by which distinct object recognition memories become linked. Adult female Wistar rats were subjected to the Novel Object Recognition Task (NORT) in an open field. Initially, the temporal window of memory persistence was established, revealing that animals lose the ability to spontaneously discriminate a familiar object 360 hours (15 days) post-training. Subsequently, to test the mnemonic link, the animals reactivated the memory of a familiar object A alongside the presentation of a novel object, C. Fifteen days after this session—a period characterized by spontaneous forgetting—the presentation of a brief reminder containing only object A was sufficient for the animals not only to recover the memory of A, but also to discriminate object C in subsequent tests, without the need for prior direct re-exposure to the latter. The results demonstrate that reconsolidation does not act by updating individual memories in isolation, but functions as a critical mediating mechanism for the formation and maintenance of stable associative links between temporally related memories.

Keywords: Reconsolidation. Object recognition. Hippocampus. Memory.

Introdução

As memórias episódicas são memórias declarativas que codificam eventos vivenciados individualmente, integrando o quê, onde e quando. Fundamentais para a execução de tarefas cotidianas, déficits na sua evocação ou persistência acarretam prejuízos funcionais significativos (SQUIRE; DEDE, 2017).

A experiência subjetiva da memória episódica é difícil de avaliar em espécies não humanas e pesquisas com roedores costumam tratar memórias contendo informações acerca do que aconteceu, onde e quando como memórias tipo episódicas, as quais podem ser codificadas de forma incidental, sem a necessidade condicionamentos com recompensas ou punições (TULVING, 1972; BIRD; CRUPI, 2003).

A memória de reconhecimento é um exemplo de memória episódica amplamente estudado e consiste na capacidade de diferenciar elementos novos de familiares e de associá-los a lugares ou contextos prévios (ROSSATO et al., 2007). Em roedores, a memória de reconhecimento é investigada com uso da tarefa de reconhecimento de objeto novo (TRON), que se baseia na tendência natural dos animais de explorar objetos novos em detrimento daqueles já conhecidos (SWEATT, 2010).

As memórias são instáveis logo após serem adquiridas e para persistirem devem passar por um processo de consolidação dependente da síntese proteica (DUDAI, 2004; IZQUIERDO et al., 2006). Após serem consolidadas, no entanto, as memórias não tornam-se fixas: podem se desestabilizar quando evocadas, sobretudo se o indivíduo percebe inconsistências entre o que sua memória indica que deve ocorrer e o que de fato ocorre ou se a evocação acontece concomitantemente à percepção de nova informação relevante (NADER et al., 2009).

A reconsolidação é o processo que reestabiliza a memória desestabilizada pela evocação na presença de novidade. A reconsolidação também depende de síntese proteica e acredita-se que seu papel biológico seja mediar a atualização das memórias evocadas (LEE et al., 2017). Nesse ponto reside a principal contribuição conceitual da reconsolidação: a maioria das memórias não é adquirida em um vácuo cognitivo, mas simultaneamente à evocação de eventos relacionados que ajudam a contextualizá-las (DANIELI et al., 2023).

A reconsolidação oferece um mecanismo pelo qual novas informações podem ser incorporadas — vinculadas — ao traço mnemônico preexistente, em vez de serem armazenadas de forma independente por consolidação. Dessa maneira, as memórias têm natureza maleável e podem ser atualizadas com novas informações presentes no momento de sua evocação, apesar de serem formadas por alterações duradouras nas conexões neuronais (DUDAI, 2002; HOEDIGER et al., 2007).

Em ratos, foi demonstrado que a memória de um objeto desconhecido, percebido pela primeira vez durante a evocação da memória de um objeto familiar, pode se formar por mecanismos de reconsolidação, associando o novo traço à informação previamente armazenada (GONZALEZ et al., 2021). Esse achado sugere que a reconsolidação não atua apenas na atualização pontual de uma memória isolada, mas na integração de memórias relacionadas adquiridas em momentos distintos, permitindo que experiências novas sejam interpretadas à luz do conhecimento prévio.

Esses achados sustentam a hipótese de que a reconsolidação medeia o vínculo e a atualização de memórias para preservar sua relevância, sendo influenciada pelo aprendizado prévio e capaz de modular as propriedades de memórias futuras. Ainda assim, os mecanismos comportamentais que determinam quando e como duas memórias distintas se conectam por reconsolidação — e não apenas se consolidam de forma independente — permanecem pouco caracterizados, ainda que falhas nessa capacidade de vincular e atualizar informações tenham impacto direto no cotidiano, contribuindo para distúrbios como amnésia e demência (DENNY; LEBOIS; RAMIREZ, 2017).

Metodologia

Animais experimentais e Cálculo amostral

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem Wistar. Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas de Memória do Instituto do Cérebro (ICe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) localizado em Natal, Rio Grande do Norte. Os animais receberam ração e água ad libitum, com um ciclo de 12h claro/escuro, tendo a temperatura controlada (21°C) e foram mantidos em suas caixas moradia, 5 animais/caixa. Nosso protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes da Lei AROUCA (Lei número 11.794, de 08 de outubro de 2008), que estabelece procedimentos para uso científico de animais, possui o número de projeto 470.059/2025 avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN.

Procedimentos comportamentais - Reconhecimento de objetos

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior explorando o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (ANTUNES e BIALA, 2012), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (REED e SQUIRE, 1997; MOSES et al., 2005). O aparato para estudar o reconhecimento de objetos consiste de um campo aberto de 60 x 60 x 60 cm localizado em uma sala com baixa luminosidade e isolamento acústico. Os objetos-estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento de objetos não possuem significância comportamental para os animais experimentais. Durante a tarefa comportamental, analisamos a exploração dos objetos pelos animais, o que é definido como cheirar ou tocar os objetos-estímulo com o focinho ou patas dianteiras. Utilizamos a ferramenta computacional TopScan Lite para gravar vídeos dos experimentos bem como fazer o cálculo do tempo de exploração dos objetos.

Antes de serem submetidos ao protocolo de treino, os animais passaram por um processo de habituação ao aparato comportamental que consistiu em uma sessão diária de vinte minutos por quatro dias consecutivos. Nesta sessão os animais foram colocados individualmente no campo aberto para que o explorassem livremente. Na sessão de treino os animais foram colocados no campo aberto na presença de dois objetos iguais. A sessão de reativação consistiu na re-exposição dos animais ao campo aberto na presença de um objeto familiar (apresentado na sessão de treino) junto a um objeto novo. A sessão de lembrete consistiu na breve re-exposição dos animais ao campo aberto na presença de um dos objetos familiares. A sessão de teste consistiu na re-exposição dos animais ao campo aberto na presença do objeto familiar (apresentado na sessão de reativação) junto a um objeto novo. Durante a sessão de treino, reativação ou teste os animais puderam explorar livremente o campo aberto e os objetos por cinco minutos. (ROSSATO et al., 2007). Na sessão de lembrete o tempo dado aos animais foi de 1 minuto.

Análise estatística dos dados

A análise estatística dos resultados foi realizada de forma concomitante à execução dos experimentos, utilizamos o programa GraphPad Prism. Para comparações entre dois grupos cuja distribuição de dados obedece uma distribuição normal, foi empregado o teste-t de Student para amostra única (valor fixo=0 para o ID) para comparar os índices de exploração ao valor base de zero. Para comparações entre dois grupos usamos o teste-t de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussões

Para investigar o vínculo entre memórias por meio da reconsolidação, foi necessário primeiro estabelecer a janela temporal de persistência da memória de reconhecimento de objetos (MRO) nas condições empregadas neste estudo. Para isso, os animais foram submetidos a uma sessão de treino (TR) de 5 minutos, na qual exploraram dois objetos

de mesma relevância exploratória, sendo então testados (TT) com um objeto familiar e um novo, em grupos independentes em diferentes intervalos após o treino (3 horas, 24 horas, 168 horas ou 360 horas). Os resultados mostram que os animais discriminaram o objeto novo do familiar em todos os intervalos até 168 horas após o treino, mas o grupo testado as 360 horas não apresentou discriminação (Figura 2B; Índice de discriminação apresentado como ID referente ao dia do TT. Os dados são apresentados como média +/- SEM; n=12; # p< 0,05 no teste t de Student com média teórica = 0). Esse dado corrobora a ideia de que, embora a consolidação confira estabilidade à memória, esta não é permanente nem imutável, ela decai com o tempo caso não seja reativada. Dessa forma, foi possível determinar o intervalo em que a memória de um objeto isolado já não é mais recuperada, permitindo isolar o efeito específico de uma reativação tardia sobre essa recuperação.

Para testar se a reconsolidação é capaz de vincular memórias de objetos, foi utilizado um segundo grupo de animais que foi treinado com dois objetos novos, A e B. Vinte e quatro horas depois, esses animais passaram por uma sessão de reativação, na qual o objeto familiar A foi reapresentado junto a um novo objeto C. Quinze dias após essa reativação, quando, conforme estabelecido no experimento anterior, os animais não discriminam mais o objeto familiar. Parte dos animais recebeu um lembrete — breve reexposição apenas ao objeto A —, enquanto os demais não passaram por essa reexposição. Vinte e quatro horas depois, os animais foram testados com os objetos (CD) ou (AD), sendo D um objeto novo introduzido apenas no teste.

Os animais que receberam o lembrete discriminaram o objeto novo D tanto no teste AD quanto no teste CD, enquanto os que não receberam o lembrete não discriminaram em nenhum dos dois testes. Notavelmente, os animais que receberam o lembrete discriminaram o objeto C mesmo sem qualquer reexposição direta e apesar de mais de 15 dias terem se passado desde seu único contato com esse objeto — intervalo em que, segundo o Experimento 1, a memória de um objeto isolado já não seria recuperada espontaneamente (Figura 3B; Índice de discriminação apresentado como média ± SEM (n=12). # p < 0,05 (teste t vs. 0); * p < 0,05 e ** p < 0,01 (ANOVA two-way, post-hoc Bonferroni)). Isso indica que o lembrete de A não recuperou apenas a memória de A, mas também a de C, sugerindo que ambas se encontram vinculadas desde a sessão de reativação. Esse achado converge com o de Gonzalez et al. (2021), que demonstrou que a memória de um objeto novo percebido durante a evocação de um objeto familiar pode se formar por reconsolidação, mas avança em relação a ele: enquanto aquele estudo evidenciou a formação vinculada das memórias logo após a reativação, o presente resultado demonstra que esse vínculo persiste e pode ser explorado semanas depois, por meio da reativação seletiva de apenas um dos elementos do par — evidência comportamental mais direta de um vínculo estável entre os traços, e não apenas de uma janela transitória de formação simultânea.

Esse resultado também se contrapõe, ao menos em parte, à visão mais tradicional de que memórias declarativas distintas, mesmo adquiridas em contextos temporalmente próximos, são armazenadas e recuperadas de forma relativamente independente (SQUIRE; DEDE, 2017; SQUIRE; MORGAN, 1988). Se assim fosse, seria esperado que a memória de C, não reativada, permanecesse esquecida independentemente do destino da memória de A; os dados aqui apresentados sugerem, ao contrário, que o destino de uma memória pode depender do de outra à qual está associada. Além disso, o fato de o lembrete ter consistido em uma reexposição breve apenas ao objeto A, sem

qualquer pista relativa a C, é digno de nota frente à literatura sobre as condições de contorno da desestabilização de memórias, que enfatiza o papel da novidade e do erro de predição na abertura da janela de labilização (NADER et al., 2009): aqui, a recuperação de C não dependeu da reapresentação de novidade relacionada a C especificamente, sugerindo que, uma vez estabelecido o vínculo entre memórias na reativação original, a reconsolidação de um dos elementos do par pode ser suficiente para reengajar o traço associado como um todo. Em conjunto, esses achados reforçam a hipótese de que a reconsolidação medeia não apenas a atualização pontual de memórias individuais, mas também a manutenção de suas relações associativas (LEE et al., 2017).

Conclusão

O presente estudo fornece sólidas evidências comportamentais de que a reconsolidação atua como um mecanismo fundamental não apenas para a atualização de memórias isoladas, mas para a integração e a manutenção do vínculo entre memórias de objetos. Foi demonstrado que, uma vez estabelecida a associação entre traços mnemônicos durante a reativação na presença de novidade, o destino de uma memória pode passar a depender diretamente do destino daquela à qual foi vinculada. A reativação de apenas um dos objetos foi suficiente para resgatar a memória do outro. Esse vínculo permitiu que a informação fosse recuperada semanas depois, período em que uma memória isolada já teria sido naturalmente esquecida.

Como recomendação para pesquisas futuras, destaca-se a importância de investigar o impacto dessas redes mnemônicas associativas em terapias humanas. Considerando que as memórias podem ser desestabilizadas por evocações indiretas, intervenções psicoterapêuticas que buscam modificar ou mitigar memórias traumáticas com base em processos de reconsolidação devem ser conduzidas com maior rigor. A utilização de lembretes ou pistas declarativas durante a psicoterapia tem o potencial de deflagrar a labilização de redes inteiras, o que pode provocar alterações imprevisíveis em outras memórias conectadas à experiência original.

Referências

Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn Process. 2012 May;13(2):93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22160349; PMCID: PMC3332351.

Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? Annu Rev Psychol. 2004;55:51-86. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050. PMID: 14744210.

Gonzalez MC, Rossato JI, Radiske A, Bevilaqua LRM, Cammarota M. Dopamine controls whether new declarative information updates reactivated memories through reconsolidation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jul 20;118(29):e2025275118. doi: 10.1073/pnas.2025275118. PMID: 34253612; PMCID: PMC8307459.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. Trends Neurosci. 2006 Sep;29(9):496-505. doi: 10.1016/j.tins.2006.07.005. Epub 2006 Jul 26. PMID: 16872686.

Lee JLC, Nader K, Schiller D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. Trends Cogn Sci. 2017 Jul;21(7):531-545. doi: 10.1016/j.tics.2017.04.006. Epub 2017 May 8. PMID: 28495311; PMCID: PMC5605913.

MOSES, Sandra N.; COLE, Carrie; RYAN, Jennifer D. Relational memory for object identity and spatial location in rats with lesions of perirhinal cortex, amygdala and hippocampus. Brain Research Bulletin, v. 65, p. 501–512, 2005. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2005.02.029.

Nader K, Hardt O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. Nat Rev Neurosci. 2009 Mar;10(3):224-34. doi: 10.1038/nrn2590. PMID: 19229241.

Reed JM, Squire LR. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. Behav Neurosci. 1997 Aug;111(4):667-75. doi: 10.1037//0735-7044.111.4.667. PMID: 9267644.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. Learn Mem. 2007 January-February;14(1):36-46. doi: 10.1101/lm.422607. PMID: 17272651; PMCID: PMC1838544.

Anexos



Figura 1. Protocolo experimental. Habituação (4 dias, 20 min/dia) seguida de treino (TR, 5 min). Posteriormente, reativação (5 min) e teste (5 min), ambos com exposição a um objeto familiar e um novo.



Figura 2. Decaimento da MRO. (A) Desenho experimental. Após treino (TR, 5 min) com objetos A e B, a memória foi testada (5 min) em diferentes intervalos (3h, 24h,

168h e 360h) com o objeto familiar A e o novo D. (B) Índice de discriminação (ID) no teste.



Figura 3. Recuperação de C via A. (A) Desenho: TR (A+B, 5 min). Após 24h, RA (A+C, 5 min). Após 15 dias, Lembrete (A, 1 min) ou Sem Lembrete (caixa vazia, 1 min). Após 24h, TT (AD ou CD, 5 min). (B) Índice de discriminação (ID).

CÓDIGO: SB0997

AUTOR: MARIA LETICIA MOREIRA DA SILVA

ORIENTADOR: EXPEDITO SILVA DO NASCIMENTO JUNIOR

TÍTULO: PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE PERFUSÃO TRANSCARDÍACA E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O ESTUDO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO EM EMBRIÕES DE GALINHA (Gallus gallus domesticus)

Resumo

A dopamina é um neurotransmissor essencial do sistema nervoso central, atuando no controle motor, na cognição, na motivação e em diversos processos comportamentais. Durante o desenvolvimento embrionário, a formação do sistema dopaminérgico depende de eventos coordenados de proliferação, diferenciação, migração e estabelecimento de conexões neurais. Nesse contexto, o modelo de embrião de galinha destaca-se em pesquisas sobre desenvolvimento embrionário e neurobiologia; entretanto, a caracterização dos núcleos dopaminérgicos nesse modelo ainda é escassa, especialmente quanto à padronização de técnicas para preservação e análise do tecido nervoso, como a perfusão transcardíaca e a imunohistoquímica. Assim, este estudo descreve a adaptação de um protocolo para estudos do sistema dopaminérgico em embriões de galinha (Gallus gallus domesticus). Os embriões foram eutanasiados no 20º dia de desenvolvimento, foram submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina e fixador paraformaldeído a 4%, seguida de dissecação, pós-fixação e criopreservação dos encéfalos. Foram realizados ajustes na pressão da bomba peristáltica e no calibre da cânula, além de modificações no protocolo de imunohistoquímica. A padronização do protocolo mostrou-se eficiente, garantindo uma boa preservação do tecido nervoso, resultando em amostras que garantem resultados consistentes para estudos morfológicos do sistema dopaminérgico.

Palavras-chave: Protocolo, embrião de galinha, sistema dopaminérgico, neuroanatomia.

TITLE: STANDARDIZATION OF TRANSCARDIAC PERFUSION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY PROTOCOLS FOR STUDYING THE DOPAMINERGIC SYSTEM IN CHICKEN EMBRYOS (Gallus gallus domesticus)

Abstract

Dopamine is an essential neurotransmitter of the central nervous system, acting in motor control, cognition, motivation, and various behavioral processes. During embryonic

development, the formation of the dopaminergic system depends on coordinated events of proliferation, differentiation, migration, and the establishment of neural connections. In this context, the chicken embryo model stands out in research on embryonic development and neurobiology; however, the characterization of dopaminergic nuclei in this model is still scarce, especially regarding the standardization of techniques for nervous tissue preservation and analysis, such as transcardiac perfusion and immunohistochemistry. Thus, this study describes the adaptation of a protocol for studies of the dopaminergic system in chicken embryos (Gallus gallus domesticus). The embryos were euthanized on the 20th day of development and subjected to transcardiac perfusion with saline solution and 4% paraformaldehyde fixative, followed by dissection, post-fixation, and cryopreservation of the brains. Adjustments were made to the peristaltic pump pressure and cannula gauge, in addition to modifications in the immunohistochemistry protocol. The standardization of the protocol proved to be efficient, ensuring good preservation of the nervous tissue, resulting in samples that guarantee consistent results for morphological studies of the dopaminergic system.

Keywords: Protocol, chicken embryo, dopaminergic system, neuroanatomy.

Introdução

A dopamina (DA) é um importante neurotransmissor monoaminérgico do sistema nervoso central, pertencente ao grupo das catecolaminas. A maior concentração de neurônios dopaminérgicos do encéfalo localiza-se no mesencéfalo ventral. Os núcleos dopaminérgicos (ND) mesencefálicos originam projeções para diferentes regiões do encéfalo, formando as principais vias dopaminérgicas. Em conjunto, essas vias desempenham um papel essencial na regulação de diversas funções fisiológicas, como o controle motor, a memória, a motivação, o estado de vigília e os mecanismos relacionados à recompensa e ao prazer, além de participar da modulação de processos comportamentais e endócrinos (1–4). Devido à sua ampla participação no sistema nervoso, as alterações homeostáticas dopaminérgicas têm sido associadas ao desenvolvimento de diferentes doenças neurológicas e neuropsiquiátricas, como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, além de transtornos relacionados à cognição, ao comportamento e ao controle motor (5–7).

Além de exercer funções essenciais no organismo adulto, o sistema dopaminérgico (SD) também desempenha papel fundamental durante o desenvolvimento embrionário. A formação dos neurônios dopaminérgicos ocorre por meio de uma sequência coordenada de eventos, que inclui proliferação, diferenciação, migração celular e estabelecimento de conexões neurais, etapas cruciais para a adequada organização e maturação dos circuitos neuronais. Alterações em qualquer um desses processos podem comprometer a arquitetura e o funcionamento desses circuitos, resultando em prejuízos ao desenvolvimento embrionário (8–11).

Nesse contexto, o embrião de galinha (EG) destaca-se como um dos principais modelos experimentais utilizados em estudos de biologia do desenvolvimento e neurociências. Por apresentar desenvolvimento embrionário externo, rápido e de baixo custo de manutenção e fácil manipulação experimental, o modelo de EG é amplamente utilizado em pesquisas voltadas ao desenvolvimento do sistema nervoso. Além disso, esse modelo apresenta mecanismos moleculares e vias de sinalização altamente conservados entre os vertebrados, permitindo a extrapolação de importantes aspectos do desenvolvimento para outras espécies.

Desse modo, apesar da descrição dos principais agrupamentos dopaminérgicos em mamíferos, os estudos voltados à caracterização dos ND em aves, especialmente durante o desenvolvimento embrionário, ainda são escassos, devido à falta de padronização da utilização desse modelo e de técnicas essenciais que garantam a preservação tecidual para experimentos posteriores, como a técnica de perfusão transcardíaca e de imuno-histoquímica.

Nesse contexto, a perfusão transcardíaca constitui uma etapa fundamental para estudos do sistema nervoso. A técnica consiste na remoção do sangue da circulação e na distribuição uniforme do fixador pelos tecidos, favorecendo a preservação da morfologia tecidual e reduzindo alterações que possam comprometer as análises subsequentes. Diante disso, a técnica de perfusão transcardíaca se torna indispensável para a caracterização dos ND do mesencéfalo em EG, uma vez que poderá contribuir para uma melhor compreensão da organização neuroanatômica do SD ao final do desenvolvimento embrionário.

Além da técnica de perfusão transcardíaca, a imunohistoquímica é essencial para estudos neuroquímicos, uma vez que possibilita a identificação de grupos celulares específicos por meio da interação entre antígenos e anticorpos. No modelo de EG, essa técnica é crucial para permitir o monitoramento minucioso da formação do sistema nervoso. Contudo, devido à fragilidade do tecido embrionário, o processamento convencional se torna mais limitado, visto que o material se torna mais vulnerável a comprometimentos estruturais significativos. Nesse contexto, surge também a necessidade de padronização de um protocolo apropriado, que preserve a delicadeza desse tipo de tecido e possibilite a aná

Metodologia

Comitê de ética e aquisição dos ovos

Para o início do projeto, foi necessária a submissão à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, a qual foi aprovada sob o nº 055/2024. Para a realização dos experimentos, foram utilizados embriões de galinha (Gallus gallus domesticus) com 20 dias de desenvolvimento, sem distinção de sexo. Os ovos, com taxa de fertilidade de 70%, foram adquiridos da empresa Ferraz Avícola (CNPJ 26.064.494/0001-61), localizada no estado de Pernambuco, Brasil. Ao todo, foram utilizados três ovos embrionados, os quais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade durante todo o período experimental.

Incubação dos ovos e ovoscopia

A incubadora utilizada foi a Tennessee Rural, modelo: Incubadora 192 (Altura x Comprimento x Largura: 45 cm x 55 cm x 44 cm), com capacidade máxima para 192 ovos, apresentando reservatório de água, rotação automática de ovos, controle de temperatura e umidade. Foi estabelecido um padrão de incubação com temperatura de 37,5° e umidade relativa de 75%, mantendo os ovos sem rotação. Ao longo da incubação, foi realizado acompanhamento diário para monitorar o desenvolvimento embrionário e garantir a viabilidade dos animais. Durante o 3º ao 7º dia de incubação, foi realizada a ovoscopia, técnica que consiste na incidência direta de uma fonte de luz ou na utilização de um equipamento específico (ovoscópio) sobre o ovo. A passagem da luz através da casca permite a visualização das estruturas internas, incluindo o embrião, a câmara de ar e a rede de vasos sanguíneos, possibilitando o monitoramento do desenvolvimento embrionário.

Eutanásia, perfusão transcardíaca e dissecação

No 20º dia de desenvolvimento, os embriões foram submetidos à eutanásia por administração intracelomática de 15 mg/EG de cetamina e 3,375 mg/EG de xilazina (três vezes a dose de anestesia). Para determinar a sobredose anestésica tomou-se como referência o trabalho realizado por Horr e colaboradores (12). Já na etapa da perfusão, os embriões foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à toracotomia para exposição do coração. Em seguida, foi realizada a punção do ventrículo esquerdo, com agulha direcionada à artéria aorta, seguida de incisão no átrio direito para permitir a exsanguinação. A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica. Inicialmente, administrou-se solução salina, com fluxo controlado, até à completa lavagem do leito vascular. Posteriormente, foi administrada a solução fixadora de paraformaldeído a 4% (PFA), em duas etapas: uma fase inicial com fluxo rápido, seguida por uma fase de fluxo lento, favorecendo a distribuição homogênea do fixador e a adequada fixação dos tecidos.

Após a fixação, procedeu-se à remoção do encéfalo. Para o início da remoção, os olhos foram retirados com o auxílio de tesoura cirúrgica e pinça anatômica, de modo que o espaço ocular auxiliasse no apoio. Logo após, foi feita uma secção sagital mediana na região posterior do pescoço, permitindo a remoção do scalp e a exposição da calota craniana. Devido à sua fragilidade, a calota foi cuidadosamente removida com auxílio de pinça anatômica, expondo as meninges. A retirada dos tecidos meníngeos, a remoção da dura-máter e das leptomeninges (aracnoide e pia-máter) foram realizadas sob estereoscópio (Motic SMZ-168). Por fim, o encéfalo foi retirado com o auxílio de pinça oftalmológica e espátula odontológica nº 31.

Após a dissecação, foram feitas a pós-fixação e a criopreservação, realizadas em três fases. Inicialmente, as amostras permaneceram em paraformaldeído a 4% overnight. Em seguida, foram transferidas para a solução de fixador sacarose a 30% overnight. Na terceira e última fase, os encéfalos foram mantidos em tampão sacarose a 30%, a 4 °C, até a realização da microtomia. Essas etapas são fundamentais para garantir a adequada preservação do tecido, possibilitando a obtenção de cortes de qualidade durante a microtomia e a posterior realização da coloração de Nissl e da utilização da técnica de imuno-histoquímica.

Resultados e Discussões

O modelo de EG é amplamente utilizado em estudos de desenvolvimento e apresenta uma gama de protocolos experimentais. Desse modo, tornou-se necessária a padronização de um protocolo experimental voltado para estudos do SD, visto que, na literatura, a descrição de técnicas experimentais, como perfusão transcardíaca e imuno-histoquímica, ainda é escassa e incerta no modelo de EG.

Diante disso, é fundamental estabelecer um protocolo padronizado que respeite a fragilidade desse tecido, a fim de garantir investigações morfológicas confiáveis, de alta resolução e que se adequem às particularidades e aos objetivos da pesquisa. Para tanto, visando à preservação morfológica do tecido nervoso, foi implementada a técnica de perfusão transcardíaca. Essa abordagem possibilita uma fixação tecidual rápida e homogênea, alcançando o encéfalo e demais órgãos por meio do próprio sistema circulatório, o que assegura a manutenção da citoarquitetura e a preservação da integridade molecular, fatores indispensáveis para a realização de análises minuciosas, como a técnica de imuno-histoquímica (14). Tal técnica, apesar de ser considerada

essencial para a fixação de tecido nervoso, ainda é escassa na literatura quanto a protocolos padronizados para utilização no modelo de EG, uma lacuna que pode decorrer tanto da complexidade do procedimento quanto das características anatômicas próprias dos embriões.

Dada essa limitação, após a administração da dose de eutanásia, foram testadas a perfusão transcardíaca e, também, a decapitação e imersão da cabeça em fixador durante 2 dias. Foi observado que a decapitação seguida da imersão foi viável quando o objetivo era apenas a fixação, dissecação do encéfalo para coloração de Nissl. Em casos de estudos que utilizem técnicas mais avançadas e detalhadas, como a imunohistoquímica, a realização da perfusão transcardíaca apresenta-se como a abordagem mais viável. .

Com isso, primeiramente, a técnica de perfusão transcardíaca foi adaptada às particularidades anatômicas e fisiológicas do EG. Diferente dos protocolos amplamente descritos para roedores adultos, nos quais o volume corpóreo e o calibre vascular permitem fluxos de perfusão mais elevados, o EG apresenta um sistema cardiovascular menor e mais frágil. O ajuste quanto à passagem das soluções fixadoras se mostrou essencial para evitar o rompimento vascular e garantir a distribuição homogênea do fixador. Nesse sentido, foi feito um ajuste da pressão da bomba peristáltica para um fluxo menor do que o protocolo já utilizado no laboratório, com a passagem de 30 mL/min durante 5 minutos de solução salina, até a completa exsanguinação e lavagem do leito vascular, e a mesma passagem de fixador paraformaldeído à 4% durante a fase rápida (30 mL/min, 5 min). Já a fase lenta do fixador paraformaldeído à 4% teve um fluxo menor que 15 ml/min durante 10 minutos.

Além da regulação da pressão da bomba peristáltica, foi necessária a utilização de uma cânula de 20 x 1,5 mm, agulha menor do que a empregada nos protocolos para roedores. Isso se deve ao fato de que, dadas as dimensões do EG, uma cânula adequada para as perfusões em roedores seria excessivamente grande para essa aplicação. O uso de uma cânula de maior calibre poderia acarretar lesões nos vasos sanguíneos do embrião, como rupturas ou extravasamentos, comprometendo a integridade tecidual e a eficácia da perfusão.

Foi observado que a implementação de um protocolo de perfusão transcardíaca se mostrou eficaz para etapas posteriores, como a utilização da técnica de imuno-histoquímica para marcação de neurônios imunorreativos à TH, uma vez que a remoção adequada do sangue circulante e a distribuição homogênea do fixador contribuem para a preservação da morfologia tecidual e dos antígenos de interesse, favorecendo a qualidade das marcações imunohistoquímicas (15). Quanto à imunohistoquímica, foram realizadas algumas alterações em relação ao protocolo original. Nesse sentido, foram implementadas lavagens seriadas das secções do encéfalo em tampão fosfato 0,1 M, etapa essencial para remover o PFA residual e reduzir o excessivo mascaramento antigênico decorrente da fixação. As lavagens foram realizadas com a técnica free-floating, porém observou-se que as secções embrionárias, por não apresentarem mielinização robusta, tendiam a dobrar-se e aderir sobre si mesmas. Com isso, para mitigar esse estresse mecânico, reduziu-se a velocidade de agitação de 60 para 52 rpm, bem como a separação do compartimento em dois poços distintos, a fim de proporcionar um espaço maior para os cortes flutuarem durante as lavagens. Adicionalmente às mudanças durante as lavagens, a manipulação das secções passou a ser feita com pincéis de cerdas finas, de forma delicada.

Além dos ajustes nas etapas de lavagem, foi implementada a utilização de borohidreto de sódio para neutralizar grupamentos aldeídos livres na estrutura tecidual, e otimizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó desnatado, reduzindo o background da marcação. Na etapa final, devido à orientação das secções no momento

da coleta, cada corte foi recolhido individualmente, corte a corte, evitando dobras e preservando a organização topográfica do tecido.

As adaptações realizadas nos protocolos de perfusão e imunohistoquímica resultaram em uma abordagem consistente e replicável, capaz de preservar tanto a morfologia quanto a antigenicidade do tecido nervoso do EG, um avanço ainda escasso na literatura. Essa contribuição metodológica é especialmente relevante para o desenvolvimento de futuros estudos com esse modelo, uma vez que a ausência de protocolos padronizados tem limitado investigações mais aprofundadas sobre o sistema nervoso em aves.

Por compartilhar mecanismos moleculares e vias de sinalização conservados entre os vertebrados, o EG permite a extrapolação de aspectos relevantes do desenvolvimento do sistema nervoso para outras espécies (16). Nesse sentido, um protocolo validado que permita a caracterização dos ND do mesencéfalo em embriões de galinha contribuirá para o entendimento da organização neuroanatômica do SDo ao longo do desenvolvimento embrionário, fornecendo embasamento para estudos comparativos entre vertebrados.

Nesse contexto, essa padronização abre caminho para investigações futuras sobre alterações do desenvolvimento dopaminérgico induzidas por fatores genéticos, farmacológicos ou ambientais (17–19), um conhecimento essencial para a compreensão de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas associadas a disfunções desse sistema.

Conclusão

A partir das etapas iniciais realizadas no projeto, foi possível desenvolver um protocolo inovador e eficiente para estudos da morfologia e caracterização neuroquímica do SD em embriões de galinha. A elaboração da otimização do protocolo, que envolveu o detalhamento dos procedimentos de eutanásia, perfusão transcardíaca, retirada do encéfalo e aplicação da técnica de imunohistoquímica , revelou-se fundamental para a padronização das técnicas aplicadas.

A padronização do protocolo garante a consistência dos resultados, reduzindo variáveis técnicas que possam interferir no desenvolvimento dos embriões ou na avaliação do SD. O refinamento das técnicas, utilizando o modelo de galinha, proporciona um ambiente controlado para avaliar a neuroanatomia e neuroquímica dos ND mesencefálicos.

A implementação da perfusão transcardíaca, associada aos ajustes no fluxo da bomba peristáltica e no calibre da cânula, possibilitou uma fixação mais homogênea e eficiente, favorecendo a preservação da integridade morfológica do tecido nervoso. Além disso, as modificações realizadas no protocolo de imunohistoquímica, especialmente nas etapas de lavagem, redução da agitação, manipulação das secções e bloqueio de marcações inespecíficas, contribuíram para a preservação das secções e da antigenicidade tecidual.

Em resumo, as adaptações na metodologia voltadas aos experimentos utilizando o modelo de EG serão amplamente aplicadas ao longo do estudo, sendo decisivas para a obtenção de resultados precisos e reprodutíveis. Além disso, a padronização e o aprimoramento metodológico estabelecidos constituem um referencial técnico para estudos futuros que demandam exatidão e uniformidade em modelos embrionários, como futuras investigações sobre alterações do desenvolvimento dopaminérgico induzidas por fatores genéticos, farmacológicos ou ambientais.

Referências

1. Harrington KA, Augood SJ, Kingsbury AE, Foster OJF, Emson PC. Dopamine transporter (DAT) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. Molecular Brain Research. 1º de fevereiro de 1996;36(1):157–62. doi:10.1016/0169-328X(95)00278-Z
2. Salamone JD, Correa M. The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. Neuron. 8 de novembro de 2012;76(3):470–85. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.021 PubMed PMID: 23141060.
3. Andretic R, Swinderen B van, Greenspan RJ. Dopaminergic Modulation of Arousal in Drosophila. Current Biology. 12 de julho de 2005;15(13):1165–75. doi:10.1016/j.cub.2005.05.025 PubMed PMID: 16005288.
4. Krüger THC, Hartmann U, Schedlowski M. Prolactinergic and dopaminergic mechanisms underlying sexual arousal and orgasm in humans. World J Urol. 1º de julho de 2005;23(2):130–8. doi:10.1007/s00345-004-0496-7
5. Morimoto S, Takao M, Hatsuta H, Nishina Y, Komiya T, Sengoku R, et al. Homovanillic acid and 5-hydroxyindole acetic acid as biomarkers for dementia with Lewy bodies and coincident Alzheimer's disease: An autopsy-confirmed study. PLOS ONE. 6 de fevereiro de 2017;12(2):e0171524. doi:10.1371/journal.pone.0171524
6. Stefani A, Pierantozzi M, Olivola E, Galati S, Cerroni R, D'Angelo V, et al. Homovanillic acid in CSF of mild stage Parkinson's disease patients correlates with motor impairment. Neurochemistry International. 1º de maio de 2017;105:58–63. doi:10.1016/j.neuint.2017.01.007
7. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochemical Pharmacology. 15 de abril de 2014;Alzheimer's Disease – Amyloid, Tau and Beyond 88(4):640–51. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024
8. Schoots André FM, Meijer RC, Denucé JM. Dopaminergic regulation of hatching in fish embryos. Developmental Biology. 1º de novembro de 1983;100(1):59–63. doi:10.1016/0012-1606(83)90200-2
9. Fidone S, Gonzalez C, Yoshizaki K. Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro. The Journal of Physiology. 1982. doi:10.1113/jphysiol.1982.sp014441
10. Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, et al. Enhanced Proliferation, Survival, and Dopaminergic Differentiation of CNS Precursors in Lowered Oxygen. The Journal of Neuroscience. 2000. doi:10.1523/jneurosci.20-19-07377.2000
11. Mironov SL, Richter DW. Oscillations and hypoxic changes of mitochondrial variables in neurons of the brainstem respiratory centre of mice. The Journal of Physiology. 2001. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0227b.x
12. Horr M, Sommerfeld S, Silva MV, Fonseca BB. A fast and simple protocol to anaesthesia in chicken embryos. Exp Anim. 2023;72(3):294–301. doi:10.1538/expanim.22-0133

13. Cavalcanti JRLP, Soares JG, Oliveira FG, Guzen FP, et al. A cytoarchitectonic and TH-immunohistochemistry characterization of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field in the rock cavy (Kerodon rupestris). Journal of Chemical Neuroanatomy. 2014. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.01.002
14. Wu, Jinyun et al. Transcardiac perfusion of the mouse for brain tissue dissection and fixation. Bio-protocol, p. e3876-e3876, 2021.
15. Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ. Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: A combined retrograde tracing and

immunohistochemical study in the rat. Journal of Comparative Neurology. 2002;454(1):15–33. doi:10.1002/cne.10420
16. Bednarczyk M, Dunislawska A, Stadnicka K, Grochowska E. Chicken embryo as a model in epigenetic research. Poultry Science. 1º de julho de 2021;100(7):101164. doi:10.1016/j.psj.2021.101164)
17. Vergara MN, Canto-Soler MV. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. Neural Dev. 27 de junho de 2012;7:22. doi:10.1186/1749-8104-7-22 PubMed PMID: 22738172; PubMed Central PMCID: PMC3541172.
18. Bjørnstad S, Austdal LPE, Roald B, Glover JC, Paulsen RE. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1º de dezembro de 2015;355(3):386–96. doi:10.1124/jpet.115.227025
19. Ribeiro LNM, Schelemper AE, da Silva MV, Fonseca BB. Chicken embryo: a useful animal model for drug testing? 2022.

CÓDIGO: SB0998

AUTOR: NINA BEVILAQUA CAMMAROTA

ORIENTADOR: JANINE INEZ ROSSATO

TÍTULO: Extinção da memória aversiva, respostas comportamentais

Resumo

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e as fobias compartilham um mesmo arranjo: uma memória aversiva adquirida, muitas vezes, em uma única exposição controla o comportamento mesmo em situações seguras. Dela decorre a esquiva, isto é, a evitação sistemática dos contextos associados ao evento. A tarefa de esquiva inibitória (TEI) reproduz esse arranjo em roedores. O rato recebe um choque nas patas ao descer de uma plataforma e, quando recolocado nela, retarda a descida; a latência mede a força dessa memória, que persiste por semanas sem retreino. A reexposição repetida ao contexto sem choque, porém, reduz progressivamente a esquiva, processo denominado extinção. O retorno da resposta após a interrupção da extinção reproduz a recaída clínica. Apesar de amplamente utilizada, a TEI exige validação, pois intensidade do choque, persistência da memória e número de sessões para extingui-la dependem das condições locais. Além disso, os parâmetros disponíveis na literatura foram estabelecidos exclusivamente em machos, embora o TEPT seja mais prevalente em mulheres. Este projeto propõe padronizar a TEI e seu protocolo de extinção em ratos Wistar adultos de ambos os sexos.

Palavras-chave: Extinção; Memória aversiva; Tarefa de esquiva inibitória

TITLE: Aversive memory extinction, behavioral answers

Abstract

Post-traumatic stress disorder (PTSD) and phobias share a common pattern: an aversive memory, often acquired during a single exposure, governs behavior even in safe situations. This leads to avoidance, defined as the systematic shunning of contexts associated with the event. The Step-down inhibitory avoidance task (IAT) reproduces this pattern in rodents. A rat receives a footshock upon stepping down from a platform; when placed back on the platform, it delays stepping down. The latency to step down measures the strength of this memory, which persists for weeks without retraining. However, repeated re-exposure to the context without the shock progressively reduces avoidance, a process known as extinction. The return of the response after the cessation of extinction mimics clinical relapse. Despite its widespread use, the IAT task requires

validation, as factors such as shock intensity, memory persistence, and the number of sessions required for extinction depend on local conditions. Furthermore, the parameters currently found in the literature were established exclusively using males, even though PTSD is more prevalent in women. This project aims to standardize the IAT task and its extinction protocol using adult Wistar rats of both sexes.

Keywords: Extinction; Aversive Memory; Step-down inhibitory avoidance task

Introdução

A memória é a capacidade do indivíduo de recordar e armazenar informações (Nader, 2015). Tem como função situar e adaptar o organismo ao meio ambiente, modificando comportamentos em função da aprendizagem de novas experiências, tornando, assim, o organismo apto a sobreviver.

Em situações de estresse e medo intenso, memórias aversivas surgem para que, em experiências similares futuras, o organismo antecipe e modifique seu comportamento antes que o dano se repita. O problema surge quando essas memórias se expressam de forma exacerbada em circunstâncias seguras, levando a comportamentos de evitação desadaptativa. No transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), nas fobias e em outros transtornos relacionados à ansiedade, estímulos que lembram a experiência original podem manter a resposta de medo e esquiva por longos períodos. A esquiva reduz o desconforto no momento, mas também impede que o indivíduo encontre evidências de segurança. Desse modo, uma resposta inicialmente protetora pode contribuir para a manutenção do problema.

Apesar da resposta aversiva criar registros relativamente duradouros e permanentes, as memórias não são fixas e imutáveis. A repetição de lembranças não reforçadas pode levar à diminuição gradual da resposta, fazendo com que o traço mnemônico seja extinto, resultando em uma nova associação que diminui a intensidade ou probabilidade da resposta original aprendida (Ferrara, N. C., et al., 2019; Inda, M. C., et al., 2011; Rodriguez-Ortiz, C. J., et al., 2005). Esse processo de diminuição da resposta de medo é chamado de extinção, e este é um processo dependente de síntese proteica, que envolve novos aprendizados que inibem a expressão de memórias previamente adquiridas (Bouton, M. E. 2004).

A tarefa de esquiva inibitória do tipo step-down permite estudar, em roedores, a formação e a expressão de uma memória aversiva, além do processo de extinção dessa memória. No treino, o rato é colocado sobre uma plataforma e recebe um choque nas patas quando desce para a grade. Em uma exposição posterior, a lembrança dessa consequência faz com que ele retarde a descida. A latência para sair da plataforma é, portanto, uma medida da expressão comportamental da esquiva. Ao longo das sessões de exposições, processo conhecido como extinção, é esperado que a latência do roedor ao descer da plataforma para a grade diminua.

Porém, a tarefa precisa ser validada em cada laboratório. A intensidade e a duração do choque, o intervalo até a primeira reexposição, o número e a duração das sessões, o

limite de observação e o contexto de teste podem modificar tanto a aquisição quanto a extinção. Além disso, muitos protocolos foram estabelecidos apenas em machos. Como a susceptibilidade a transtornos relacionados ao medo não é igual entre os sexos, a inclusão de fêmeas não deve ser tratada como uma etapa secundária. O protocolo precisa produzir aquisição e permitir acompanhar a extinção nos dois sexos, e as diferenças encontradas precisam ser descritas antes que o modelo seja empregado em estudos moleculares ou farmacológicos.

O projeto foi proposto para padronizar a tarefa e seu protocolo de extinção em ratos Wistar adultos de ambos os sexos, e o realizamos em duas etapas: a primeira, apenas com ratos machos, submetidos a um treino de tentativa única e divididos em dois grupos: o grupo controle, o qual não foi submetido ao protocolo de extinção, e o grupo de extinção, o qual passou por cinco sessões consecutivas, uma por dia, nas quais a descida não foi seguida de choque. A análise verifica se houve aquisição e se a expressão da esquiva diminuiu nos dois grupos; e a segunda, com machos e fêmeas, na qual ambos os grupos foram submetidos ao protocolo de extinção, no qual se verificou depois se houveram diferenças significativas na qualidade do processo de extinção de memórias aversivas.

Metodologia

Animais experimentais e Cálculo amostral

Foram utilizados ratos machos e fêmeas adultos da linhagem Wistar. Todo o estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas de Memória do Instituto do Cérebro (ICe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) localizado em Natal, Rio Grande do Norte. Os animais receberam ração e água ad libitum e permaneceram em ciclo de 12h claro/escuro, tendo a temperatura controlada (21°C). Foram mantidos 5 animais por caixa. O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes da Lei AROUCA (Lei número 11.794, de 08 de 10 de 2008), que estabelece procedimentos para uso científico de animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRN.

Procedimento comportamentais na tarefa de esquiva inibitória (EI)

A tarefa de esquiva inibitória é um paradigma de condicionamento ao medo muito utilizado, no qual o estímulo condicionado é a parte segura da caixa, a plataforma; o estímulo incondicionado é um choque nas patas do roedor quando o animal desce da plataforma, e a resposta condicionada é permanecer na área segura, resultando no aumento da latência de descida da plataforma após a exposição ao estímulo incondicionado (Cammarota et al., 2004; Bevilaqua et al., 2003).

O treino foi realizado em uma caixa de Plexiglas de 50 x 25 x 25 cm equipada com um piso de grade através do qual choques foram aplicados nas patas. Na extremidade esquerda do piso gradeado há uma plataforma de madeira de 5 × 8 × 25 cm. Para o treinamento, os animais foram colocados na plataforma voltados para o canto traseiro

esquerdo da caixa de treinamento e, quando descem para a grade com as quatro patas recebem um choque (0,4 mA durante 2 segundos). Imediatamente após o choque os animais foram removidos da caixa de treinamento e retornaram para a gaiola moradia.

A aquisição desta memória envolve uma única sessão de treinamento, onde os indivíduos associam uma informação aversiva, o choque nas patas, com o local onde o receberam, evitando o mesmo na sessão de teste.

Para extinguir a memória de esquiva, os animais foram submetidos a uma sessão diária de evocação não reforçada durante 5 dias consecutivos. Para isto os animais foram colocados na plataforma da caixa de treino, e quando eles desceram dela não receberam o choque, sendo-lhes permitido explorar a caixa de treino durante 30 segundos.

O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico ao empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebeu choque. Para as sessões de treino e teste foram adotados tempos máximos de descida, sendo 30 segundos para a sessão de treino e 300 segundos para as sessões de extinção e teste, após os quais o animal foi devolvido à sua caixa moradia. Aqueles animais que durante a sessão de treino não descem da plataforma antes de transcorridos 30 segundos foram eliminados do estudo, bem como os animais que ao final das sessões de extinção mostraram tempos de descida maiores que 30 segundos. Os testes foram realizados 15 dias após a sessão de treino.

Análise estatística dos dados

A análise estatística dos resultados foi feita usando os programas GraphPad Prism e MatLab. Para comparações entre os grupos controle e de extinção, foi usado o teste-t, e para comparação entre machos e fêmeas, foi usado a Anova de duas vias de Medidas Repetidas. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussões

O protocolo de extinção promove a atenuação efetiva da memória de esquiva inibitória

Para confirmar que a perda da resposta aversiva decorreu do protocolo de extinção e não do mero decaimento temporal, além de que os materiais utilizados e a intensidade do choque foram adequados para o processo de extinção e criação de uma memória aversiva, os animais foram testados após cinco sessões de extinção (grupo EXT, n = 14) ou após intervalo equivalente de 15 dias sem extinção (grupo N-EXT, n = 12) (Figura 1). No grupo N-EXT, a latência de descida aumentou significativamente do treino para o teste ($t(11) = 4,338$; $p = 0,0012$; teste t pareado; diferença média =158,6 s), demonstrando a retenção da memória aversiva a longo prazo. Em contraste, o grupo EXT não apresentou diferença significativa entre o treino e o teste ($t(13) = 0,8221$; $p = 0,4259$; teste t pareado; diferença média = 3,21s), indicando extinção completa da resposta de medo. Como resultado, no dia do teste, a latência do grupo EXT foi

significativamente menor que a do grupo N-EXT (t(24) = 4,535; p = 0,0001; teste t não pareado; EXT: 13,4 s vs. N-EXT: 173,30 s).

Diferenças sexuais na latência de descida durante a extinção da memória

Para investigar o dimorfismo sexual na dinâmica da extinção, machos e fêmeas (n = 72 sujeitos no total) foram submetidos ao protocolo de extinção (Figura 2). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito principal significativo de sessão ($F(2,811; 196,8) = 47,02$; $p < 0,0001$; $\varepsilon = 0,7028$), confirmando a redução progressiva das latências de descida ao longo dos dias em ambos os sexos. Observou-se também efeito principal significativo de sexo ($F(1; 70) = 8,046$; $p = 0,0060$), no qual os machos apresentaram latências sistematicamente maiores que as fêmeas (média: 116,50 s vs. 76,01 s; diferença = 40,52 ± 14,29 s). Contudo, a interação sexo x sessão não foi significativa ($F(4; 280) = 1,036$; $p = 0,3890$), indicando que, embora as magnitudes absolutas de latência tenham diferido entre os sexos, a taxa e o perfil temporal de extinção ocorreram de maneira equivalente em machos e fêmeas.

Conclusão

Em conclusão, nossos achados validam o protocolo de extinção na esquiva inibitória como um paradigma eficaz para a investigação acerca da extinção da memória aversiva em ratos. A persistência de altas latências de descida no grupo que não passou pelo processo de extinção aos 15 dias confirma que a redução da resposta de esquiva no grupo submetido à extinção ocorreu devido à reexposição não reforçada ao ambiente aversivo, e não de um mero decaimento temporal do traço mnemônico. Além disso, embora as fêmeas tenham apresentado latências absolutas sistematicamente menores que os machos ao longo do protocolo, ambos os sexos exibiram qualidade de extinção equivalente. Em conjunto, este protocolo padronizado estabelece uma abordagem metodológica sólida para futuros estudos dedicados ao aprofundamento dos mecanismos neurobiológicos e moleculares subjacentes à extinção do medo condicionado em ambos os sexos.

Referências

Bevilaqua LRM. et al. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. European Journal of Neuroscience, v. 17, n. 4, p. 897–902, fev. 2003.

Bouton, M. E. Context and behavioral processes in extinction. Learning & memory, 11(5), 485-494, 2004.

Cammarota M, Barros DM, Vianna MR, Bevilaqua LR, Coitinho A, Szapiro G, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I. The transition from memory retrieval to extinction. An Acad Bras Cienc. 76(3):573-82, 2004.

Ferrara, N. C., Jarome, T. J., Cullen, P. K., Orsi, S. A., Kwapis, J. L., Trask, S., Pullins, S. E., & Helmstetter, F. J. GluR2 endocytosis-dependent protein degradation in the amygdala mediates memory updating. Scientific reports, 9(1), 5180, 2019.

Inda, M. C., Muravieva, E. V., & Alberini, C. M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 31(5), 1635–1643, 2011.

Rodriguez-Ortiz, C. J.; DE LA CRUZ, V.; Gutierrez, R.; Bermudez-Rattoni, F. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. Learning & Memory, v. 12, n. 5, p. 533–537, 2005.

Nader, K. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7(10), a021782, 2015.

Anexos



Figura 1: A tarefa de esquiva inibitória (TEI) atenua efetivamente a retenção da memória de medo em roedores.



Figura 2: Ratos machos e fêmeas exibem qualidade de extinção comparável, apesar de diferenças nas latências absolutas de descida.



Anexo 1: Certificado de curso de manejo de animais

CÓDIGO: SB1000

AUTOR: GUILHERME PINHEIRO DUARTE

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Avaliação do potencial antiofídico do ácido clorogênico contra os efeitos causados pela peçonha de Bothrops erythromelas

Resumo

A peçonha de *Bothrops erythromelas* (BeV) contém toxinas como metaloproteases (SVMPs), serinoproteases (SVSPs), fosfolipases A2 (PLA2s) e L-aminoácidos oxidases (LAAOs). Embora a soroterapia neutralize efeitos sistêmicos letais, é pouco eficaz contra danos teciduais locais, demandando adjuvantes. Nesse contexto ácido clorogênico (AC) apresenta-se como biomolecula promissora para esta finalidade. Este estudo avaliou o potencial inibitório *in vitro* do AC sobre as atividades proteolítica, fosfolipásica e coagulante de BeV. Ensaios enzimáticos foram realizados em diferentes proporções (BeV:AC; p:p). A atividade proteolítica (azocaseína) apresentou inibição progressiva: 30,7±2,6% em 1:10, 76,0±2,6% em 1:30 e máxima de 85,0±5,0% em 1:50. Em contrapartida, a atividade de PLA2 (gema de ovo) mostrou-se menos suscetível, iniciando inibição dose-dependente em 1:35 (2,9±1,2%) e atingindo 18,5±1,8% em 1:50. Nos testes de coagulação, BeV coagulou eficientemente o plasma citratado humano, mas não o fibrinogênio purificado, refletindo a ausência de enzimas thrombin-like (SVTLEs) e a dependência de ativadores de protrombina e Fator X. Os resultados comprovam a promissora ação antiofídica *in vitro* do AC, destacada pelo forte bloqueio proteolítico, sugerindo seu potencial como estratégia complementar para mitigar danos teciduais locais no envenenamento botrópico.

Palavras-chave: Atividade antiofídica, Bothrops erythromelas, Ácido clorogênico

TITLE: Evaluation of the antivenom potential of chlorogenic acid against the effects caused by Bothrops erythromelas venom.

Abstract

Bothrops erythromelas venom (BeV) contains toxins such as metalloproteinases (SVMPs), serine proteinases (SVSPs), phospholipases A2 (PLA2s), and L-amino acid oxidases (LAAOs). Although antivenom therapy neutralizes lethal systemic effects, it is less effective against local tissue damage, creating a need for adjuvants. In this context, chlorogenic acid (CA) emerges as a promising biomolecule for this purpose. This study evaluated the *in vitro* inhibitory potential of CA on the proteolytic, phospholipase, and coagulant activities of BeV. Enzymatic assays were performed at various ratios (BeV:CA; w/w). Proteolytic activity (azocasein assay) showed progressive inhibition: 30.7 ± 2.6% at 1:10, 76.0 ± 2.6% at 1:30, and a maximum of 85.0 ± 5.0% at 1:50. In contrast, PLA2 activity (egg yolk assay) was less susceptible, showing the onset of dose-dependent inhibition at 1:35 (2.9 ± 1.2%) and reaching 18.5 ± 1.8% at 1:50. In coagulation tests, BeV efficiently coagulated human citrated plasma but not purified fibrinogen, reflecting the absence of thrombin-like enzymes (SVTLEs) and a reliance on prothrombin and Factor X activators. The results demonstrate the promising *in vitro* antivenom activity of CA highlighted by strong inhibition of proteolysis suggesting its potential as a complementary strategy to mitigate local tissue damage in *Bothrops* envenomation.

Keywords: Antivenom activity, Bothrops erythromelas, Chlorogenic acid

Introdução

O envenenamento causado por picada de serpentes é uma questão de saúde pública no Brasil, segundo dados obtidos pelo Sistema de Informações e Agravos de Notificação (SINAN). De acordo com o Ministério da Saúde, ocorreram 342.652 acidentes ofídicos entre 2021 e 2024. Em 2023, esse tipo de acidente ocasionou 140 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* apresenta uma mistura de biomoléculas complexas contendo, principalmente metaloproteases (SVMP), serinoproteases (SVSP), fosfolipases A2 (PLA2) e L-aminoácidos oxidases (LAAO).

Plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos bioativos que podem complementar o tratamento do envenenamento por picada de serpente, e o ácido clorogênico (AC) é um composto fenólico derivado de plantas que já foi objeto de estudo de avaliação de seu potencial antiofídico frente peçonhas de *Bothrops brazili* e *Bothrops leucurus* (Ferreira et al. 2025; Silva et al. 2022). Diante das limitações da soroterapia em reverter danos teciduais no sítio da picada, evidencia-se uma lacuna associada à ausência de tratamentos de ação local. Nesse contexto, a prospecção de agentes adjuvantes de derivados naturais, como os compostos fenólicos de plantas medicinais torna-se relevante.Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi realizar ensaios enzimáticos *in vitro* para verificar o potencial antiofídico do ácido clorogênico (AC) contra os efeitos mediados pelos principais grupos enzimáticos presentes na peçonha de *Bothrops erythromelas*, nomeadamente proteases, fosfolipases, hialuronidases e coagulantes. Atualmente foram realizados ensaios para avaliação da inibição das enzimas proteolíticas e fosfolipálicas que apresentaram resultados importantes para a discussão sobre este agente bioativo e suas aplicações frente ao tratamento de envenenamentos ofídicos.

Metodologia

1. Peçonha de *Bothrops erythromelas* (BeV) e ácido clorogênico (AC).

A peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* (BeV) foi cedida pela Professora Karla Patrícia de Oliveira Luna da Universidade Estadual da Paraíba, com uso científico aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen - processo nº A4E8DE0), e então liofilizada e mantida a -20ºC até o uso. Soluções de peçonha foram preparadas em tampão fosfato-salino (PBS, constituído de: NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH2PO4 1,5 mM e Na2HPO4, pH 7,4) no momento do uso. A quantidade de peçonha foi expressa em conteúdo de proteína, determinado pelo método de Bradford, utilizando albumina como padrão (BRADFORD, 1976).

O ácido clorogênico (AC) (CAS: 327-97-9) foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich® (San Luis, Missouri, EUA) com grau de pureza de 95%.

2. Atividade fosfolipásica

A inibição da atividade fosfolipásica *in vitro* foi avaliada turbidimetricamente em microplacas de 96 poços, adaptando-se a metodologia descrita na literatura (Félix-Silva et al. 2017). Utilizou-se como substrato uma suspensão de gema de ovo em PBS (1:3), centrifugada a 697 g por 2 minutos. Para padronizar o ensaio, diluiu-se o substrato em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 200 mM e CaCl2 5 mM) e PBS até obter-se uma concentração com absorbância de 0,6 a 925 nm. A peçonha foi pré-incubada a 37 °C por 30 minutos em banho-maria na presença de diferentes concentrações do ácido testado, sendo BeV:AC (p:p) 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50. Em seguida, 100 µL da amostra foram adicionados aos poços contendo a suspensão de gema de ovo e tampão Tris-HCl (1:9). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 90 minutos, procedendo-se à leitura da absorbância em 925 nm. A concentração de 5µg foi escolhida seguindo padrão determinado por ensaios prévios (Batista. 2022). A atividade da peçonha resulta na redução da turbidez e, consequentemente, da absorbância. O controle positivo, constituído pela peçonha na ausência do composto fenólico, foi considerado como 100% de atividade enzimática. Para as amostras contendo o ácido clorogênico, o percentual de substrato remanescente foi calculado pela razão entre a média da absorbância da amostra e a média da absorbância do controle positivo, multiplicada por 100. O percentual de inibição da atividade fosfolipásica foi então obtido pela diferença entre 100% e o percentual de substrato remanescente. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata (n = 3).

3. Atividade proteolítica sobre azocaseína

A inibição da atividade proteolítica *in vitro* foi avaliada sobre o substrato azocaseína (1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5), com adaptações da metodologia descrita (Moura et al. 2011). Diferentes concentrações da peçonha (em PBS) foram pré-incubadas a 37 °C por 30 minutos na presença de diferentes concentrações do ácido em teste, sendo BeV:AC (p:p) 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de azocaseína aos poços de teste e 100 µL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 200 mM e CaCl2 5 mM) aos brancos, incubando-se a mistura a 37 °C por 120 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido trifluoroacético a 5%. Após 30 minutos em

temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 22 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos, alcalinizados com 100 µL de NaOH 0,5 M e a absorbância foi mensurada a 440 nm em leitor de microplacas de 96 poços. A concentração de 5µg foi escolhida seguindo padrão determinado por ensaios prévios (Batista. 2022). A atividade proteolítica foi calculada como o percentual de produtos de degradação da azocaseína, assumindo o controle contendo apenas a peçonha como 100% de atividade. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata (n = 3).

4.Atividade coagulante

A atividade coagulante foi determinada utilizando plasma humano ou fibrinogênio (6 mg/mL em PBS), com adaptações da metodologia descrita (Theakston e Reid 1983). Para a determinação da dose coagulante mínima, diferentes concentrações da peçonha foram pré-incubadas a 37 °C por 30 minutos, enquanto o substrato (plasma ou fibrinogênio) foi mantido sob pré-incubação na mesma temperatura por 2 minutos. Alíquotas de 100 µL de substrato foram distribuídas em cubetas e combinadas com as frações da peçonha, registrando-se o tempo de formação do coágulo em coagulômetro digital. Para a análise sobre o plasma humano foram utilizadas concentrações da amostra em 0,5 µg, 0,75 µg, 1 µg e 1,5 µg. Já para análise sobre fibrinogénio purificado foram utilizadas concentrações da amostra em 1 µg, 5 µg e 10 µg. A menor quantidade de peçonha capaz de induzir a coagulação em 120 segundos foi estabelecida para os testes subsequentes.

5. Eletroforese SDS-PAGE

O perfil proteico foi determinado por método de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE). Antes da aplicação no gel, 10 µg da peçonha foram adicionadas foram adicionadas a tampão de amostra (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M) em proporção 1:1 (v/v), fervidas por 5 minutos a 100ºC e resfriadas à temperatura ambiente. O gel foi submetido à corrida eletroforética em voltagem constante (130v) e corrente máxima de 50 mA em sistema de mini-gel. Após a corrida, o gel foi corado em Coomassie Brilliant Blue G-250 (Félix-Silva et al. 2014; Menezes. 2013).

Resultados e Discussões

1. Perfil proteico da peçonha de *Bothrops erythromelas*

A análise eletroforética (SDS-PAGE) da peçonha de *Bothrops erythromelas* (BeV) revelou um perfil proteico complexo e heterogêneo. Destaca-se uma intensa concentração de bandas na região entre 25 e 35 kDa, que podem corresponderpredominantemente às serinoproteases do veneno de serpente (SVSP) e às metaloproteinases da classe P-I. Adicionalmente, observou-se a presença de bandas proeminentes na faixa de 50 a 70 kDa, que podem corresponder a metaloproteinases da classe P-III (SVMPs) e L-aminoácido oxidases (LAAO) (Figura 1). Essa constituição é corroborada pelos dados de composição proteômica da peçonha, os quais apontam as PIII-SVMPs (com variações expressivas

entre 29,8% e 45,5%), as serino proteases e as fosfolipases A2 do tipo Asp49(com composição de proximamente 10-15% da peçonha) como as classes de toxinas mais abundantes na peçonha desta espécie (Jorge et al. 2021). O perfil eletroforético analisado apresenta bandas com massas moleculares compatíveis com as classes protéicas descritas na literatura.

2. Inibição da Atividade Fosfolipásica

A avaliação do potencial inibitório do ácido clorogênico (AC) frente à atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. erythromelas* (BeV) demonstrou uma resposta dependente da concentração. Nas proporções iniciais (BeV:AC de 1:30 a 1:45), o percentual de inibição permaneceu reduzido, variando entre 0,5% e 6,5%, na proporção de 1:30 e 1:45, respectivamente. Contudo, ao atingir a proporção de 1:50 (p:p), observou-se o maior efeito inibitório, alcançando aproximadamente 18,5% de inibição da atividade enzimática (Figura 2).

Em comparação, contra a peçonha de *Bothrops leucurus* o ácido clorogênico apresentou uma inibição superior (21%) utilizando uma proporção consideravelmente menor de AC (1:10) (Silva et al. 2022). Esse comportamento sugere um efeito inibitório crescente porém limitado do ácido em interagir e neutralizar as fosfolipases A2 da peçonha, toxinas diretamente associadas à miotoxicidade, à degradação de membranas celulares e à resposta inflamatória induzida pelo envenenamento botrópico (Jorge et al. 2015).

3. Inibição da Atividade Proteolítica

Diferentemente do observado para a atividade fosfolipásica, a inibição da atividade proteolítica apresentou elevada sensibilidade às proporções testadas. Na menor proporção avaliada (1:5, BeV:AC), não foi observada inibição. No entanto, a partir da proporção 1:10 (p:p), detectou-se uma inibição de aproximadamente 30%, a qual aumentou expressivamente para 60% na proporção 1:20 e ultrapassou 75% na proporção 1:30. A máxima inibição proteolítica foi atingida na proporção 1:50 (p:p), superando 84% de inibição (Figura 3). Essa neutralização reflete uma possível ação do ácido sobre as proteases da peçonha, entre elas as metaloproteinases (SVMPs) e serino proteases (SVSP) conhecidamente abundantes na peçonha de *B. erythromelas*, que são as principais responsáveis pela degradação tecidual, hemorragia e proteólise local observadas no envenenamento (Jorge et al. 2015).

A expressiva inibição da atividade proteolítica destaca-se como o achado relevante. Essa eficácia dependente da concentração corrobora a ação descrita para ácidos fenólicos e extratos vegetais sobre proteases botrópicas. Estudos prévios demonstraram que o ácido clorogênico e o ácido rosmarínico inibem significativamente proteases de *Bothrops brazili* e *Bothrops leucurus*, mecanismo associado à interação desses compostos com metaloproteinases (SVMPs) e à subsequente mitigação de danos hemorrágicos *in vivo* (Ferreira et al. 2025; Silva et al. 2022). De forma semelhante, extratos ricos em polifenóis, como o de *Jatropha gossypiifolia*, apresentaram inibição proteolítica superior a 80% frente às peçonhas de *B. erythromelas*. Esses achados reforçam a suscetibilidade das proteases de *B. erythromelas* à inibição por derivados fenólicos, evidenciando seu potencial no bloqueio da degradação tecidual local (Felix-Silva et al. 2017).

4. Atividade Coagulante e Ação sobre Fibrinogênio e Plasma

Na determinação do tempo de coagulação em plasma frente a diferentes massas de peçonha de *B. erythromelas*, observou-se tal relação: o aumento da quantidade de peçonha de 0,5 µg para 1,5 µg promoveu a redução do tempo de coagulação de cerca de 70 segundos para aproximadamente 37 segundos (Figura 4). Por outro lado, quando avaliada a atividade coagulante direta sobre o fibrinogênio purificado (6 mg/mL), a peçonha de *B. erythromelas* não foi capaz de induzir a coagulação nas massas testadas de 1 µg, 5 µg e 10 µg dentro do tempo limite pré-determinado de 120 segundos (Tabela 1).

Tal capacidade de coagular plasma total associada à inatividade sobre o fibrinogênio isolado se deve a *B. erythromelas* apresentar uma deleção gênica da enzima do tipo trombina (snake venom thrombin-like enzyme SVTLE), resultando na ausência de enzimas capazes de clivar diretamente o fibrinogênio em monômeros de fibrina (Lotto et al. 2021). Em comparação de espécies como *Bothrops leucurus*, que possuem altos níveis de SVTLEs ativas, a peçonha de *Bothrops erythromelas* exibe uma atividade pró-coagulante significativamente maior em plasma humano, essa potente ação coagulante da *B. erythromelas* sobre decorre da presença abundante de ativadores de protrombina (como a metaloproteinase) e ativadores do Fator X (Venancio de Lima et al. 2025).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o AC possui um potencial inibitório sobre enzimas presentes na peçonha de *Bothrops erythromelas*, destacando-se pela relevante atividade inibitória sobre atividade proteolítica e efeito menor sobre a atividade fosfolipásica nas condições avaliadas. Como as metaloproteinases e serino proteases representam a maior fração protéica da peçonha de *B. erythromelas* e são as principais responsáveis pelos danos teciduais locais, hemorragia e degradação da matriz extracelular, a inibição proteolítica promovida pelo AC é importante para impedir os efeitos citados. Nesse contexto, os dados in vitro sugerem o efeito inibitório direto do AC sobre as enzimas presentes na BeV, justificando a realização de estudos adicionais para investigar o ácido clorogênico como adjuvante terapêutico na abordagem dos efeitos locais da peçonha.

Referências

BARROS, C.; SILVA; MIRANDA, M. R. Prospecção Tecnológica: potencial terapêutico de moléculas presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops sp*., com ênfase na espécie *Bothrops jararaca*. Cadernos de Prospecção, v. 17, n. 2, p. 586–602, 1 abr. 2024.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248–254, 1976

BATISTA, Beatriz Ketlyn da Cunha. Comparação da atividade antiofídica in vitro do extrato e fração enriquecida de fenólicos da espécie *Jatropha gossypiifolia* frente a peçonha da serpente *Bothrops erythromelas*. 2022.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypiifolia.* Toxicon, v. 125, p. 74–83, 2017.
FERREIRA, S. DE S. et al. The potential of phenolic acids in therapy against snakebites: A review. Toxicon, v. 208, p. 1–12, 2022.

FERREIRA, Sarah de Sousa et al. Phenolic acids inhibit local and systemic effects induced by *Bothrops brazili* venom. Biochimie, v. 238, pt. B, p. 143-158, 2025.
GUTIÉRREZ, J. M,; RUCAVADO, A., Chaves, F., Díaz, C., & Escalante, T. (2009). Patologia experimental de dano tecidual local induzido por veneno de cobra *Bothrops asper.* Toxicon, 54 (7), 958-975.
HORA, P. S. et al. Renal functional and structural alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops leucurus* venom. Toxicon, v. 234, p. 107265, out. 2023.

JORGE, Roberta Jeane B. et al. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. Journal of Proteomics, v. 114, p. 93-114, 2015.

LIMA, Eduardo Oliveira Venancio de et al. Understanding the effects of *Bothrops erythromelas* and *Bothrops leucurus* venoms on human blood coagulation. Toxicon, v. 255, p. 108231, 2025.

LOTTO, Natália P. et al. The absence of thrombin-like activity in *Bothrops erythromelas* venom is due to the deletion of the snake venom thrombin-like enzyme gene. PLoS ONE, v. 16, n. 4, e0248901, 2021.

MENEZES, Yamara Arruda Silva de. "Extração, caracterização e atividades biológicas de proteínas da espécie cnidoscolus urens (L.) Arthur." 2013.
MOURA, V. M. et al. Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of *Aniba fragrans* Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by *Bothrops atrox*. Journal of Ethnopharmacology, v. 213, n. September 2017, p. 350–358, 2018.
PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. African adders: partial characterization of snake venoms from three Bitis species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 2, p. 1–19, 2015.

SILVA, Diana Pontes da et al. Antiophidic potential of chlorogenic acid and rosmarinic acid against *Bothrops leucurus* snake venom. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 148, p. 112766, 2022.
THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bulletin of the World Health Organization, v. 61, n. 196, p. 949–956, 1983.

Anexos



Figura 1: Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) da peçonha de Bothrops erythromelas.



Figura 2: Efeito inibitório do ácido clorogênico sobre a atividade fosfolipásica da peçonha de B. erythromelas.



Figura 3: Efeito inibitório do ácido clorogênico sobre a atividade proteolítica da peçonha de B. erythromelas.



Figura 4: Efeito de diferentes quantidades da peçonha de B. erythromelas sobre o tempo de coagulação no plasma humano.



Tabela 1: Atividade coagulante da peçonha de Bothrops erythromelas no fibrinogênio.

CÓDIGO: SB1001

AUTOR: LÍVIA MARIA CARNEIRO SOARES

COAUTOR: LUCAS DENYLSON RIBEIRO FARIAS SANTOS

COAUTOR: RODRIGO OLIMPIO ORVATE ARRUDA

COAUTOR: JANINE INEZ ROSSATO

COAUTOR: JOHSEPH PABALLO GOMES DE SOUZA

COAUTOR: GENEDY KARIELLY DA SILVA APOLINARIO

ORIENTADOR: MARTIN PABLO CAMMAROTA

TÍTULO: Atividade eletrofisiológica do hipocampo durante a extinção da memória aversiva

Resumo

A extinção da memória aversiva corresponde à redução progressiva da resposta condicionada após a apresentação repetida do estímulo condicionado na ausência do estímulo aversivo, sendo mediada pela formação de uma nova memória que inibe a expressão da memória original. A esquiva inibitória (EI) constitui um modelo experimental adequado para investigar esse processo e seus correlatos neurais. Este estudo teve como objetivo investigar a dinâmica da atividade oscilatória hipocampal durante a formação da memória de extinção na EI. Ratos Wistar foram submetidos ao protocolo de extinção, com registro de potenciais de campo local (LFP) na região CA1 do hipocampo dorsal. A atividade eletrofisiológica foi analisada quanto à potência espectral em diferentes períodos da sessão, especialmente antes e após a descida da plataforma. Os resultados evidenciaram alterações na atividade oscilatória hipocampal, com modificações nas bandas teta, gama e de alta frequência (HFO), sobretudo em momentos relacionados à tomada de decisão e à exploração do ambiente. Esses achados indicam que a atividade hipocampal é dinamicamente modulada durante a extinção da memória aversiva, reforçando o papel do hipocampo na reorganização das respostas associadas à memória aversiva. A caracterização dessas mudanças contribui para a compreensão dos mecanismos neurais envolvidos na formação e regulação da memória de extinção ao longo desse processo comportamental.

Palavras-chave: Extinção; esquiva inibitória; hipocampo; acoplamento teta-HFO.

TITLE: Hippocampal electrophysiological activity during aversive memory extinction

Abstract

Aversive memory extinction corresponds to the progressive reduction of the conditioned response after repeated presentation of the conditioned stimulus in the absence of the aversive stimulus and is mediated by the formation of a new memory that inhibits expression of the original memory. Inhibitory avoidance (IA) is a useful experimental model for investigating this process and its neural correlates. This study aimed to investigate the dynamics of hippocampal oscillatory activity during extinction memory formation in IA. Wistar rats underwent an extinction protocol while local field potentials (LFPs) were recorded from the CA1 region of the dorsal hippocampus. Electrophysiological activity was analyzed in terms of spectral power across different periods of the session, particularly before and after stepping down from the platform. The results revealed changes in hippocampal oscillatory activity, including alterations in theta, gamma, and high-frequency oscillation (HFO) bands, especially during periods associated with decision-making and environmental exploration. These findings indicate that hippocampal activity is modulated during aversive memory extinction, reinforcing the role of the hippocampus in reorganizing responses associated with aversive memory. Characterizing these changes contributes to understanding the neural mechanisms involved in the formation and regulation of extinction memory throughout this behavioral process.

Keywords: Extinction; inhibitory avoidance; hippocampus; theta-HFO coupling.

Introdução

A aprendizagem da memória aversiva por condicionamento pavloviano representa um modelo fundamental para compreender os processos de aprendizagem e memória no sistema nervoso central (Pavlov, 1927). Nessa forma de aprendizagem, um estímulo inicialmente neutro é associado a um estímulo aversivo, promovendo respostas condicionadas que apresentam importância adaptativa. Entretanto, a flexibilidade comportamental requer que o organismo modifique essas respostas quando a apresentação do estímulo condicionado para de ser seguida pelo estímulo aversivo, desencadeando o processo conhecido como extinção da memória (Rescorla, 2001). A extinção não corresponde ao apagamento da memória original, mas à formação de uma nova aprendizagem que inibe a expressão da memória previamente adquirida (Bouton, 2017).

A tarefa de esquiva inibitória constitui um modelo experimental utilizado para investigar os mecanismos envolvidos na aprendizagem e na extinção de memórias aversivas. Nessa tarefa, o animal aprende a evitar a descida de uma plataforma associada a um estímulo aversivo. Posteriormente, quando o animal é exposto novamente ao ambiente na ausência do estímulo aversivo, ocorre a redução progressiva da resposta de esquiva, permitindo investigar os mecanismos neurais relacionados à extinção (Izquierdo et al., 2006; Izquierdo et al., 2016).

O hipocampo desempenha papel fundamental na formação, organização e recuperação de memórias, particularmente na representação das informações contextuais associadas às experiências. A atividade do hipocampo também apresenta padrões oscilatórios relacionados a diferentes processos cognitivos e comportamentais. Entre esses padrões estão as oscilações teta, gama e de alta frequência, cuja dinâmica pode variar de acordo com o estado comportamental do animal e com as demandas relacionadas à aprendizagem e à memória (Tort et al., 2009; Radiske et al., 2020).

As oscilações teta apresentam papel importante na organização temporal da atividade neuronal hipocampal, estando relacionadas à codificação e recuperação de memórias e à tomada de decisão. Por sua vez, oscilações em frequências mais altas, incluindo as bandas gama e de alta frequência (HFO), podem refletir diferentes tipos de processamento da informação no hipocampo. A interação entre essas oscilações, por meio do acoplamento fase-amplitude, constitui um mecanismo potencial de organização da atividade neural e tem sido associada a processos de memória e comportamento (Tort et al., 2009; Radiske et al., 2017; Amemiya; Redish, 2018; Yang et al., 2019).

Resultados obtidos previamente no hipocampo dorsal demonstraram que o acoplamento entre oscilações teta e de alta frequência (teta-HFO) apresenta dinâmica específica durante a extinção da esquiva inibitória. Foram registrados potenciais de campo local na região CA1 e analisado o acoplamento entre diferentes frequências durante os momentos da sessão de extinção. Observou-se aumento transitório do acoplamento teta-HFO imediatamente antes da tomada de decisão, efeito que não foi observado durante a pré-exposição ou após a extinção. Além disso, esse padrão apresentou relação com medidas comportamentais de esquiva, sugerindo associação entre a dinâmica oscilatória hipocampal e a tomada de decisão durante a extinção.

Diante desses achados, torna-se relevante caracterizar de maneira mais ampla a atividade eletrofisiológica do hipocampo durante a extinção da memória aversiva. Assim, o presente projeto concentra-se na investigação da dinâmica das oscilações hipocampais durante a extinção da esquiva inibitória, buscando compreender como diferentes bandas de frequência são moduladas ao longo dos diferentes momentos comportamentais da tarefa.

Metodologia

Sujeitos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com aproximadamente 3 meses de idade e peso entre 300 e 350 g no início dos experimentos. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade, com água e ração disponíveis ad libitum, em ciclo claro/escuro de 12 horas, e os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob protocolo nº 038/2023 e certificado nº 354.038/2023.

Procedimentos cirúrgicos e registro eletrofisiológico

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de matrizes de microeletrodos de tungstênio destinadas ao registro de potenciais de campo local (LFP). Na etapa experimental que fundamenta os resultados apresentados, os eletrodos foram direcionados ao stratum oriens da região CA1 do hipocampo dorsal. As matrizes continham 16 canais e foram confeccionadas conforme descrito previamente (Rossato et al., 2019). As coordenadas utilizadas para CA1 foram AP −4,2 mm, ML ±2,4 mm e DV −3,0 mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007). Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam meloxicam como medida analgésica. Após a cirurgia, permaneceram em recuperação por 7 a 10 dias antes do início dos experimentos.

Tarefa de esquiva inibitória

Foi utilizada a tarefa de esquiva inibitória (step-down), realizada em uma caixa metálica de 50 × 25 × 25 cm, com piso constituído por barras de bronze de 1 mm de diâmetro, espaçadas em 1 cm, e uma plataforma de madeira de 7 × 25 cm localizada em uma das extremidades.

Na etapa de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma, voltados para a parede oposta à grade. Ao descerem e tocarem a grade com as quatro patas, receberam um choque elétrico de 0,4 mA durante 2 s e foram imediatamente retirados do aparato. Vinte e quatro horas após o treino, foi realizada a sessão de extinção. Inicialmente, registrou-se a latência para a descida da plataforma, com limite máximo de 600 s. Após a descida, os animais puderam explorar livremente o aparato durante 300 s, sem receber choque. Quarenta e oito horas após o treino, foi realizado o teste de retenção da extinção, no qual a latência para descer da plataforma foi novamente registrada.

Registro e processamento dos sinais eletrofisiológicos

A atividade elétrica encefálica foi registrada durante as sessões experimentais, exceto durante o treino. Antes de cada sessão, foi obtido um registro basal em campo aberto familiar durante 20 minutos, sendo selecionado um período de 30 segundos no qual o animal permanecia imóvel para servir como referência basal. Os sinais foram adquiridos utilizando o sistema CerePlex Direct (Blackrock Microsystems), com taxa de amostragem de 1 kHz e filtro passa-banda de 0,3–500 Hz.

Para a análise da sessão de extinção, os registros foram alinhados ao momento exato da descida da plataforma e segmentados em janelas de 5 segundos. As janelas foram agrupadas em quatro períodos: início da sessão, pré-descida, pós-descida e fim da sessão. A potência espectral foi calculada para as bandas de interesse após filtragem do sinal, utilizando o método de Welch, com normalização pela potência basal de cada animal.

Análise do acoplamento fase-amplitude

O acoplamento fase-amplitude (PAC) foi calculado nos mesmos segmentos utilizados para a análise espectral. Os sinais foram filtrados nas bandas correspondentes à fase e à amplitude e processados pela Transformada de Hilbert para obtenção da fase

instantânea e do envelope de amplitude. O Índice de Modulação (MI) foi utilizado como medida da intensidade do acoplamento, sendo calculado a partir da distribuição da amplitude de HFO em relação à fase da oscilação teta.

Para caracterizar a relação entre as oscilações, foram analisados particularmente os sinais de teta (5–10 Hz) e HFO (150–170 Hz). Também foram produzidos comodulogramas para diferentes combinações de frequências. A significância dos padrões de acoplamento foi avaliada por meio de dados surrogados gerados por deslocamento temporal do envelope de amplitude, sendo considerado significativo o MI acima do 99º percentil da distribuição nula ($p < 0,01$).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas em ambiente Python, adotando nível de significância de $p < 0,05$. A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Para os dados comportamentais, foram utilizados os testes de Wilcoxon, Mann-Whitney e Friedman, conforme o desenho experimental, além do teste de Dunn para comparações post hoc. As latências também foram analisadas por curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e teste de log-rank. Os dados eletrofisiológicos foram analisados por comparações intraindividuais e entre grupos, utilizando testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a distribuição dos dados.

Estudo histológico

Ao final dos experimentos eletrofisiológicos, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos, crioprotegidos em sacarose a 30% e seccionados coronalmente em cortes de 50 µm. A localização dos eletrodos na região CA1 do hipocampo dorsal foi confirmada por coloração de Nissl e análise em microscópio óptico, sendo incluídos nas análises finais apenas os animais com posicionamento confirmado dos eletrodos.

Resultados e Discussões

Inicialmente, foi validado o protocolo de extinção de sessão única da tarefa de esquiva inibitória. Conforme apresentado na Figura 1, os animais foram submetidos ao treino (TR) e posteriormente divididos em dois grupos: Extinção (Ext), submetido à sessão de extinção 24 horas após o treino, e No-Ext, que permaneceu na gaiola até o teste. A Figura 1A-B apresenta o desenho experimental dos dois protocolos, enquanto a Figura 1C apresenta a latência de descida da plataforma durante as diferentes sessões. No grupo No-Ext, houve aumento significativo da latência entre TR e TT ($W = 0$; $p = 0,0078$; teste de Wilcoxon pareado), indicando manutenção da memória aversiva. No grupo Ext, a latência aumentou significativamente entre TR e EXT ($W = 0$; $p = 0,002$) e diminuiu significativamente entre EXT e TT ($W = 1$; $p = 0,0039$; teste de Wilcoxon pareado), demonstrando redução da resposta de esquiva após a sessão de extinção. Além

disso, no teste realizado 48 horas após o treino, os grupos Ext e No-Ext diferiram significativamente (U = 75; p = 0,002; teste de Mann-Whitney U). Os dados foram apresentados como mediana ± intervalo interquartil, com n = 8–10 animais por grupo.

Após a validação do protocolo comportamental, foi investigado se a implantação dos microeletrodos no hipocampo dorsal interferiria na aquisição ou na extinção da memória de esquiva inibitória. Na Figura 2A, é apresentado o protocolo experimental utilizado nos animais implantados, envolvendo as sessões de treino, extinção e teste. A Figura 2B apresenta as latências de descida nas três sessões. A análise de medidas repetidas pelo teste de Friedman revelou diferença significativa entre as sessões ($\chi^2(2) = 17,64$; p = 0,0001). O teste post hoc de Dunn demonstrou aumento significativo da latência entre TR e EXT (p < 0,0001), indicando aquisição da memória aversiva, seguido de redução significativa entre EXT e TT (p = 0,0050), evidenciando a extinção da resposta de esquiva. A comparação entre TR e TT não apresentou diferença significativa (p = 0,3839), indicando retorno da resposta aos níveis observados no treino. Os dados foram apresentados como mediana ± intervalo interquartil (n = 11). Na Figura 2C, a coloração de Nissl confirmou o posicionamento dos eletrodos no stratum oriens da região CA1 do hipocampo dorsal. Apenas animais com posicionamento adequado dos eletrodos foram incluídos nas análises subsequentes.

Em seguida, foi analisada a potência espectral da banda teta (5–10 Hz) durante a sessão de extinção (Figura 3). A Figura 3A apresenta os espectrogramas correspondentes aos diferentes períodos comportamentais, enquanto a Figura 3B mostra a variação temporal da potência de teta, normalizada em relação ao baseline, em janelas de 5 segundos. A Figura 3C apresenta a média da potência normalizada nos diferentes blocos comportamentais. A análise por ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo sobre a potência teta ($F(24,240) = 2,00$; p = 0,0047; $\eta^2g = 0,083$). Em comparação ao baseline, observado como potência normalizada igual a 1, houve aumento significativo da potência no bloco pré-descida (média = 1,47; t = 2,35; p = 0,041) e no bloco pós-descida (média = 1,73; t = 3,29; p = 0,008), enquanto os blocos inicial (média = 1,24; p = 0,231) e final (média = 1,34; p = 0,126) não diferiram significativamente do baseline. Assim, a potência teta apresentou aumento principalmente nos períodos imediatamente anterior e posterior à descida da plataforma. Os dados foram apresentados como média ± EPM, com n = 11 animais, e as comparações com o baseline foram realizadas por teste t de uma amostra.

A Figura 4 apresenta a análise da potência espectral da banda gama lenta (35–55 Hz). Na Figura 4A, são apresentados os espectrogramas dos diferentes períodos da sessão; a Figura 4B mostra a variação temporal da potência normalizada e a Figura 4C apresenta a média da potência nos blocos comportamentais. A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito significativo do tempo sobre a potência de gama lenta ($F(24,240) = 1,85$; p = 0,011; $\eta^2g = 0,090$). Em relação ao baseline, houve aumento significativo da potência no início da sessão (média = 1,43; t = 3,17; p = 0,010), redução no bloco pré-descida (média = 1,35; t = 2,91; p = 0,015) e novo aumento no bloco pós-descida (média = 1,43; t = 4,83; p = 0,001). No bloco final, a potência não diferiu significativamente do baseline (média = 1,16; t = 2,21; p = 0,052). As comparações foram realizadas por teste t de uma amostra, considerando o baseline como valor de referência.

Na Figura 5, foi avaliada a potência espectral da banda gama rápida (65–100 Hz). A Figura 5A apresenta os espectrogramas representativos dos diferentes períodos comportamentais, a Figura 5B mostra a variação temporal da potência normalizada e a Figura 5C apresenta a média da potência em cada bloco. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo sobre a potência de gama rápida ($F(24,240) = 2,61$; $p < 0,001$; $\eta^2g = 0,109$). A potência foi significativamente maior que o baseline no bloco pré-descida (média = 1,38; $t = 2,79$; $p = 0,019$) e apresentou seu maior aumento no bloco pós-descida (média = 1,53; $t = 6,39$; $p < 0,001$). Já os blocos inicial (média = 1,21; $p = 0,086$) e final (média = 1,30; $p = 0,054$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao baseline. Esses dados indicam que a atividade de gama rápida apresentou maior potência no período associado à descida da plataforma e à exploração inicial do aparato.

Por fim, a Figura 6 apresenta a análise da potência espectral da banda de alta frequência (HFO; 150–170 Hz). Na Figura 6A, são apresentados os espectrogramas dos diferentes períodos comportamentais; a Figura 6B mostra a variação temporal da potência HFO normalizada pelo baseline e a Figura 6C apresenta a média da potência nos diferentes blocos. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo sobre a potência HFO ($F(24,240) = 2,21$; $p = 0,0014$; $\eta^2g = 0,058$). Em comparação ao baseline, a potência HFO apresentou aumento significativo no intervalo imediatamente após a descida (média = 1,45; $t = 2,23$; $p = 0,050$). Não foram observadas diferenças significativas nos blocos inicial ($p = 0,489$), pré-descida ($p = 0,143$) e final ($p = 0,328$). Dessa forma, a potência HFO apresentou aumento principalmente no período pós-descida, acompanhando o momento de exploração inicial do aparato. Os dados foram apresentados como média ± EPM, com $n = 11$ animais, e as comparações com o baseline foram realizadas por teste t de uma amostra.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o protocolo de extinção de sessão única da esquiva inibitória foi eficaz na redução da resposta de esquiva, confirmando a adequação do modelo comportamental utilizado. Além disso, os animais submetidos à implantação de microeletrodos no hipocampo dorsal apresentaram aquisição e extinção preservadas da memória aversiva, indicando que o procedimento cirúrgico e o registro eletrofisiológico não comprometeram o desempenho comportamental. A análise histológica confirmou o posicionamento dos eletrodos na região CA1 do hipocampo dorsal, permitindo relacionar de forma confiável os sinais registrados aos diferentes momentos da tarefa.

A análise da potência espectral revelou que a atividade oscilatória do hipocampo se modifica ao longo da sessão de extinção. A banda teta apresentou aumento significativo nos períodos imediatamente anterior e posterior à descida da plataforma, enquanto a gama lenta apresentou alterações ao longo da sessão, com aumento no início e no período pós-descida. A gama rápida também apresentou maior potência nos períodos pré e pós-descida, com maior aumento após a descida. As oscilações de alta frequência, por sua vez, apresentaram aumento principalmente no período pós-descida.

Em conjunto, esses achados indicam que a atividade eletrofisiológica da região CA1 é dinamicamente modulada durante a extinção da memória aversiva. As alterações observadas nas diferentes bandas de frequência ocorreram principalmente em momentos relacionados à descida da plataforma e à exploração do ambiente, sugerindo que a atividade hipocampal acompanha diferentes estados comportamentais ao longo da tarefa.

Dessa forma, o presente estudo contribui para a caracterização da dinâmica oscilatória do hipocampo dorsal durante a extinção da esquiva inibitória. A identificação de padrões temporais específicos nas oscilações teta, gama lenta, gama rápida e HFO fornece uma base para compreender como a atividade de CA1 se relaciona à atualização de uma memória previamente associada a uma experiência aversiva. Esses resultados também sustentam futuras análises sobre a relação entre os diferentes ritmos hipocampais e o comportamento durante o processo de extinção.

Referências

AMEMIYA, S.; REDISH, A. D. Hippocampal theta-gamma coupling reflects state-dependent information processing in decision making. Cell Reports, v. 25, p. 3894-3897, 2018.

BOUTON, M. E. Learning and behavior: a contemporary synthesis. [S. l.]: Sinauer Associates, 2017.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. Trends in Neurosciences, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. Physiological Reviews, v. 96, n. 2, p. 695-750, 2016.

PAVLOV, I. P. Conditional reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford: Oxford University Press, 1927.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2007.

RADISKE, A. et al. Prior learning of relevant nonaversive information is a boundary condition for avoidance memory reconsolidation in the rat hippocampus. Journal of Neuroscience, v. 37, n. 40, p. 9675-9685, 2017.

RADISKE, A. et al. Cross-frequency phase-amplitude coupling between hippocampal theta and gamma oscillations during recall destabilizes memory and renders it susceptible to reconsolidation disruption. Journal of Neuroscience, v. 40, n. 33, p. 6398-6408, 2020.

RESCORLA, R. A. Experimental extinction. In: MOWRER, R. R.; KLEIN, S. B. (ed.). Handbook of contemporary learning theories. [S. l.]: Psychology Press, 2001. p. 119-154.

ROSSATO, J. I. et al. PKMζ inhibition disrupts reconsolidation and erases object recognition memory. Journal of Neuroscience, v. 39, n. 10, p. 1828-1841, 2019.

TORT, A. B. L. et al. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 49, p. 20942-20947, 2009.

YANG, Y. et al. A novel method to trigger the reconsolidation of fear memory. Behaviour Research and Therapy, v. 122, p. 103461, 2019.

Anexos



Figura 1 - Validação do protocolo de extinção de sessão única.



Figura 2 - Animais implantados com microeletrodos no hipocampo dorsal exibem aquisição e extinção normais da memória de esquiva inibitória.



Figura 3 - Potência espectral da banda teta (5-10 Hz) durante a sessão de extinção.



Figura 4 - Potência espectral da banda gama lenta (35-55 Hz) durante a sessão de extinção.



Figura 5 - Potência espectral da banda gama rápida (65-100 Hz) durante a sessão de extinção.



Figura 6 - Potência espectral da banda HFO (150-170 Hz) durante a sessão de extinção.

CÓDIGO: SB1002

AUTOR: MADSON FREIRE

ORIENTADOR: ALICE DE MORAES CALVENTE

TÍTULO: Biomassa e carbono na FLONA de Nísia Floresta: uma análise focada na faixa sensível da parcela do PPBIO

Resumo

A estimativa da biomassa acima do solo e do estoque de carbono é importante para compreender a estrutura da vegetação e sua contribuição para o armazenamento de carbono em florestas tropicais. Este estudo teve como objetivo estimar a biomassa acima do solo e o estoque de carbono de indivíduos arbóreos presentes nas faixas sensíveis das cinco parcelas do PPBio na Floresta Nacional de Nísia Floresta, RN. Foram analisados 478 indivíduos com diâmetro à altura do peito (DAP) entre 1 e 10 cm, utilizando dados de DAP, altura e identificação taxônomica. A biomassa acima do solo foi estimada no software R por meio do pacote BIOMASS, utilizando o modelo alométrico de Chave *et al.* (2014). Os valores individuais foram somados por parcela e padronizados para hectare. A biomassa total estimada foi de 2,01957 Mg, com valores entre 11,2 e 21,9 Mg ha^{-1} entre as parcelas. O estoque de carbono acima do solo variou de 5,26 a 10,3 Mg C ha^{-1}. Observou-se relação positiva entre DAP e altura e entre DAP e biomassa. O teste de Kruskal–Wallis não indicou diferença significativa na distribuição da biomassa individual entre as parcelas. Os resultados constituem uma caracterização inicial dos estoques de biomassa e carbono da vegetação arbórea de pequeno porte nas áreas avaliadas e podem servir como referência para futuras avaliações temporais da dinâmica desses estoques na FLONA de Nísia Floresta.

Palavras-chave: Biomassa; Carbono; regeneração; Mata Atlântica; Floresta Nacional.

TITLE: Biomass and Carbon in the Nísia Floresta National Forest: An Analysis Focused on the Sensitive Zone of the PPBIO Plot

Abstract

Estimating aboveground biomass and carbon stock is important for understanding vegetation structure and its contribution to carbon storage in tropical forests. The objective of this study was to estimate the aboveground biomass and carbon stock of tree individuals present in the sensitive zones of the five PPBio plots in the Nísia Floresta National Forest, RN. A total of 478 trees with a diameter at breast height (DBH) between 1 and 10 cm were analyzed, using data on DBH, height, and taxonomic

identification. Above-ground biomass was estimated using the R software package BIOMASS, based on the allometric model by Chave *et al.* (2014). Individual values were summed per plot and normalized per hectare. The estimated total biomass was 2.01957 Mg, with values ranging from 11.2 to 21.9 Mg ha^{-1} across the plots. Above-ground carbon stock ranged from 5.26 to 10.3 Mg C ha^{-1}. A positive relationship was observed between DBH and height, and between DBH and biomass. The Kruskal–Wallis test did not indicate a significant difference in the distribution of individual biomass among the plots. The results provide an initial characterization of biomass and carbon stocks in small-statured tree vegetation in the evaluated areas and may serve as a reference for future temporal assessments of the dynamics of these stocks in the Nísia Floresta National Forest (FLONA).

Keywords: Biomass; Carbon; Regeneration; Atlantic Forest; National Forest.

Introdução

A regeneração natural de florestas secundárias desempenha um papel importante na mitigação das mudanças climáticas, na conservação da biodiversidade e na manutenção dos serviços ecossistêmicos em paisagens tropicais (Poorter *et al.*, 2016; Oberleitner *et al.*, 2021). Estimar a biomassa acima do solo (AGB) e os estoques de carbono é fundamental para compreender a dinâmica ecológica desses ambientes e sua contribuição para o sequestro de carbono. A recuperação da biomassa e da diversidade nas florestas secundárias, no entanto, depende de múltiplos fatores, como a história de uso do solo, o estágio de regeneração, as condições edáficas e o grau de conectividade com outros fragmentos (Chave *et al.*, 2014; Feldpausch et al., 2012).

Assim, o monitoramento de parâmetros estruturais e florísticos é uma estratégia para avaliar o papel ecológico dessas formações no contexto das mudanças climáticas e da conservação. A recuperação da biomassa em florestas secundárias ocorre ao longo do processo de regeneração, mas apresenta variações entre locais, sendo influenciada por condições ambientais, histórico de uso da terra e características da paisagem. Em escala neotropical, Poorter *et al.* (2016), a partir da análise de 45 sítios e aproximadamente 1.500 parcelas, demonstraram a elevada capacidade de recuperação da biomassa de florestas secundárias, embora com diferenças nas taxas de recuperação entre os locais avaliados.

De forma semelhante, Oberleitner *et al.* (2021), ao avaliar florestas secundárias no sudoeste da Costa Rica, observaram rápida acumulação de biomassa acima do solo, especialmente nos primeiros anos de sucessão, alcançando aproximadamente 52% da biomassa de florestas maduras após 20 anos. Os autores também observaram diferenças na trajetória de recuperação entre as áreas avaliadas, reforçando a importância do acompanhamento temporal para compreender a dinâmica da biomassa e do armazenamento de carbono em florestas secundárias (Oberleitner *et al.*, 2021; Poorter *et al.*, 2016).

A FLONA de Nísia Floresta, localizada no litoral do Rio Grande do Norte, abriga um mosaico de ambientes que inclui áreas em estágio avançado de regeneração, bem como áreas previamente destinadas a experimentos florestais e diferentes tipos de manejo. Apesar de sua importância ecológica, os dados sobre os estoques de biomassa, carbono e diversidade na regeneração secundária local ainda são limitados. Em 2024 foi

estabelecido um módulo Rapeld de parcelas permanentes dentro da Rede PPBio Mata Atlântica na Flona, e dentro de cada parcela há uma faixa sensível central onde este estudo foi realizado. Estudos realizados em unidades de conservação brasileiras demonstram a aplicabilidade de inventários florestais e equações alométricas para a quantificação da biomassa e do carbono em diferentes componentes da vegetação, incluindo indivíduos pertencentes ao estrato regenerante (Moraes *et al.*, 2025).

A aplicação de metodologias padronizadas para estimativa de biomassa, como o pacote BIOMASS, permite integrar informações de diâmetro, altura e densidade da madeira para estimar a biomassa acima do solo em inventários florestais tropicais (Réjou-Méchain *et al.*, 2017). Entretanto, diferentes etapas do cálculo podem contribuir para a incerteza das estimativas, sendo necessário considerar as limitações associadas aos dados e aos procedimentos empregados (Réjou-Méchain *et al.*, 2017). Dessa forma, a análise das faixas sensíveis podem fornecer uma caracterização inicial dos estoques de biomassa e carbono na área amostrada, embora a pequena extensão do recorte limite a extrapolação direta dos resultados para toda a FLONA.

Este estudo tem como objetivo estimar a biomassa acima do solo e o estoque de carbono das espécies arbóreas presentes nas faixas sensíveis das parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, gerando uma caracterização inicial desses estoques para subsidiar o monitoramento da regeneração florestal.

Metodologia

A pesquisa foi realizada na Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLONA de Nísia Floresta), no Rio Grande do Norte, em área de Floresta Estacional Semidecidual inserida no domínio da Mata Atlântica. O estudo utilizou dados provenientes das cinco parcelas permanentes do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio) estabelecidas na área, seguindo o protocolo RAPELD de amostragem. Cada parcela possui 40 × 250 m, sendo considerada neste estudo exclusivamente a faixa sensível, correspondente a uma faixa contínua de 1 m de largura por 250 m de comprimento, totalizando 250 m² por parcela. Essa delimitação corresponde ao recorte utilizado na pesquisa anterior para a caracterização dos indivíduos arbóreos de menor porte.

Foram analisados 478 indivíduos arbóreos registrados nas cinco parcelas, com diâmetro à altura do peito (DAP) $\geq$ 1 cm e $\leq$ 10 cm, incluindo informações de identificação taxonômica, DAP e altura. Os dados foram organizados e conferidos no ambiente R, sendo o DAP utilizado em centímetros e a altura em metros, conforme as unidades requeridas pelas funções empregadas na estimativa da biomassa. O conjunto de dados foi submetido a procedimentos de conferência, incluindo verificação de valores ausentes, valores não positivos e ocorrência de indivíduos com DAP superior ao limite estabelecido para o estudo.

A estimativa da biomassa acima do solo (Aboveground Biomass – AGB) foi realizada no software R, utilizando o pacote BIOMASS (Réjou-Méchain et al., 2017), desenvolvido para padronizar etapas da estimativa de biomassa em inventários florestais tropicais e possibilitar a avaliação das incertezas associadas ao cálculo. Inicialmente, foram

organizadas as informações taxonômicas de família, gênero e espécie para a obtenção da densidade da madeira por meio da função getWoodDensity(). Os valores foram obtidos a partir do Global Wood Density Database (Zanne *et al.*, 2009), sendo atribuídos conforme a disponibilidade das informações taxonômicas na base de referência e os procedimentos implementados pelo pacote (Réjou-Méchain *et al.*, 2017). O nível de atribuição da densidade foi registrado para cada indivíduo, permitindo identificar a origem da estimativa e verificar eventuais atribuições realizadas em níveis taxonômicos superiores.

A biomassa acima do solo de cada indivíduo foi estimada por meio da função computeAGB(), utilizando como variáveis de entrada o DAP, a densidade da madeira e a altura dos indivíduos. O cálculo emprega o modelo alométrico generalizado para árvores tropicais desenvolvido por Chave *et al.* (2014) e implementado no pacote BIOMASS. Para a estimativa, além do DAP (cm) e da altura (m), foi utilizado a densidade da madeira (g cm^{-3}). O resultado foi obtido em megagramas (Mg), equivalente a toneladas de biomassa por indivíduo.

Posteriormente, os valores individuais de biomassa foram somados para cada parcela e padronizados para a área de um hectare. Como cada faixa sensível possui 0,025 ha, a biomassa total obtida em cada parcela foi dividida por essa área, resultando em valores expressos em Mg ha^{-1}. Também foram calculadas estatísticas descritivas da biomassa individual por parcela, incluindo média, desvio-padrão e número de indivíduos.

A relação entre as características estruturais dos indivíduos também foi avaliada graficamente. Foram analisadas as relações entre DAP e altura e entre DAP e biomassa acima do solo. Para representar as tendências dessas relações, foram utilizadas curvas de suavização LOESS (locally estimated scatterplot smoothing), permitindo visualizar padrões sem pressupor previamente uma relação linear ou uma forma funcional paramétrica específica.

O estoque de carbono acima do solo foi estimado a partir da biomassa acima do solo utilizando uma fração de carbono de 0,471, de modo que o carbono de cada indivíduo foi calculado pela multiplicação da AGB pelo fator de conversão. O valor de 0,471 corresponde à razão média de carbono da biomassa utilizada no pacote BIOMASS, baseada em dados de conteúdo de carbono de angiospermas tropicais compilados por Thomas e Martin (2012), e é próximo ao valor padrão de 0,47 recomendado pelo IPCC para a fração de carbono da biomassa florestal acima do solo.

Os valores individuais de carbono foram posteriormente somados para cada parcela e convertidos para Mg ha^{-1} utilizando a mesma área de 0,025 ha. Dessa forma, foram obtidas estimativas do estoque de carbono acima do solo para cada uma das cinco parcelas. O procedimento realizado no script mantém separadas as estimativas de biomassa e carbono, sendo o carbono derivado diretamente da biomassa por meio do fator de conversão de 0,471.

Para avaliar possíveis diferenças entre as parcelas, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos. A normalidade foi previamente avaliada e, quando os pressupostos de normalidade não foram atendidos, utilizou-se o teste de Kruskal–Wallis para comparação entre as parcelas. Quando identificado resultado significativo ($p < 0,05$), foi previsto o emprego do teste pós-hoc de Dunn, com correção de Bonferroni, para identificar quais pares de parcelas apresentaram diferenças significativas.

Resultados e Discussões

Caracterização dos dados analisados

Foram analisados os dados registrados dos 478 indivíduos arbóreos presentes nas cinco parcelas da faixa sensível do PPBio, com DAP médio variando de 3,48 cm na parcela 5 a 3,88 cm na parcela 4, enquanto as médias de altura variaram de 3,65 m na parcela 2 a 4,56 m na parcela 3.

As distribuições de DAP apresentaram evidência de não normalidade nas cinco parcelas (Shapiro–Wilk: $p = 2{,}98 \times 10^{-9}$; $6{,}04 \times 10^{-7}$; $1{,}18 \times 10^{-6}$; $9{,}12 \times 10^{-5}$; e $2{,}42 \times 10^{-8}$, respectivamente). Para a altura, também foram observados valores estatisticamente significativos em todas as parcelas ($p = 1{,}39 \times 10^{-7}$; $1{,}29 \times 10^{-11}$; $7{,}87 \times 10^{-8}$; $6{,}99 \times 10^{-5}$; e $1{,}84 \times 10^{-5}$). O teste de Kruskal–Wallis não indicou diferença significativa no DAP entre as parcelas ($\chi^2 = 5{,}8631$; gl = 4; $p = 0{,}2096$). Porém, a altura apresentou diferença entre as parcelas segundo o teste de Kruskal–Wallis ($\chi^2 = 13{,}443$; gl = 4; $p = 0{,}009301$). No teste pós-hoc de Dunn com correção de Bonferroni, foram identificadas diferenças entre as parcelas 1 e 2 (p ajustado = 0,0355), 2 e 3 (p ajustado = 0,0078), 2 e 4 (p ajustado = 0,0467) e 2 e 5 (p ajustado = 0,0147). As demais comparações apresentaram p ajustado $\geq 0{,}05$.

Relação entre altura e DAP

A relação entre DAP e altura dos 478 indivíduos é apresentada na Figura 1. Os registros concentraram-se principalmente entre 1 e 5 cm de DAP e aproximadamente 125 e 500 cm de altura. Também foram observados indivíduos entre 5 e 7,5 cm de DAP e 500 a 750 cm de altura, enquanto os maiores valores de altura, entre aproximadamente 750 e 1.250 cm, ocorreram principalmente entre indivíduos com DAP de aproximadamente 7 a 10 cm. A curva de suavização LOESS apresentou tendência crescente ao longo da relação entre as duas variáveis. Essa tendência é coerente com a importância dessa relação para a caracterização estrutural e para a estimativa de biomassa. Réjou-Méchain *et al.* (2017) destacam que a relação altura–diâmetro constitui uma das etapas relevantes nos procedimentos de estimativa de AGB, podendo apresentar variação associada às condições locais da vegetação.

Figura 1 – Relação entre altura (cm) e diâmetro à altura do peito (DAP, cm) dos indivíduos arbóreos amostrados na faixa sensível das cinco parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.

Essa relação, entretanto, pode variar entre diferentes regiões e condições florestais. Feldpausch *et al.* (2012) demonstraram que a relação entre altura e diâmetro apresenta variação substancial entre florestas tropicais, estando associada não apenas ao diâmetro dos indivíduos, mas também a características climáticas, à estrutura da floresta, às condições do solo e à localização geográfica. Dessa forma, embora a tendência crescente observada no presente estudo seja esperada, a relação altura–DAP pode apresentar características específicas associadas às condições locais da FLONA de Nísia Floresta (Feldpausch *et al.*, 2012).

Relação entre DAP e biomassa acima do solo

A relação entre DAP e biomassa acima do solo dos 478 indivíduos é apresentada na Figura 2. A biomassa individual apresentou valores entre $7{,}04 \times 10^{-5}$ e 0,0453 Mg. Os valores mais baixos concentraram-se entre os indivíduos de menor DAP, enquanto os maiores valores de biomassa ocorreram entre indivíduos com maiores diâmetros. A curva de suavização LOESS apresentou tendência crescente entre DAP e biomassa acima do solo.

Figura 2 – Relação entre diâmetro à altura do peito (DAP, cm) e biomassa acima do solo por indivíduo (Mg) dos indivíduos arbóreos amostrados na faixa sensível das cinco parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.

A distribuição da biomassa também deve ser interpretada considerando a estrutura de tamanho dos indivíduos amostrados. Moraes *et al.* (2025), em uma floresta ombrófila densa na Floresta Nacional de Carajás, observaram que a maior contribuição para os estoques de biomassa e carbono ocorreu em uma classe de grande diâmetro, apesar da maior abundância de indivíduos estar concentrada nas classes menores. Esse resultado evidencia que a contribuição dos indivíduos para os estoques de biomassa não é necessariamente proporcional à sua abundância, uma vez que diferenças no porte podem resultar em grande variação na biomassa individual. No presente estudo, entretanto, o recorte amostral foi limitado a indivíduos com DAP de até 10 cm, restringindo a análise aos indivíduos de menor porte e não permitindo avaliar a contribuição de árvores de maiores dimensões para os estoques totais da floresta. Assim, os valores obtidos representam especificamente o componente arbóreo de menor porte presente nas faixas sensíveis.

Estimativa da biomassa acima do solo

A biomassa acima do solo total estimada para os 478 indivíduos foi de 2,01957 Mg, equivalente a 2.019,57 kg. Os valores de biomassa total por parcela foram de 0,548 Mg na parcela 1, 0,358 Mg na parcela 2, 0,505 Mg na parcela 3, 0,279 Mg na parcela 4 e 0,329 Mg na parcela 5. Após a padronização para um hectare, os valores corresponderam a 21,9 Mg ha^{-1} na parcela 1, 14,3 Mg ha^{-1} na parcela 2, 20,2 Mg ha^{-1} na parcela 3, 11,2 Mg ha^{-1} na parcela 4 e 13,2 Mg ha^{-1} na parcela 5 (Figura 3).

A variação observada entre as parcelas deve ser interpretada considerando a escala e o delineamento do presente estudo. A análise realizada neste trabalho está restrita às cinco faixas sensíveis do PPBio e representa a condição dos indivíduos no período em que os dados foram coletados, não permitindo estimar diretamente a trajetória temporal de recuperação da biomassa. Em escala neotropical, Poorter *et al.* (2016) avaliaram a recuperação da biomassa em 45 sítios e aproximadamente 1.500 parcelas, enquanto Oberleitner *et al.* (2021) acompanharam 12 florestas secundárias no sudoeste da Costa Rica, utilizando informações históricas para estabelecer a idade das áreas e realizando novo censo após quatro anos. Em conjunto, esses estudos mostram que a recuperação da biomassa ocorre ao longo do processo sucessional, mas pode apresentar taxas distintas entre locais e condições ambientais (Poorter *et al.*, 2016; Oberleitner *et al.*, 2021). Dessa forma, os valores obtidos nas parcelas da FLONA devem ser considerados como uma caracterização inicial da biomassa acima do solo, que poderá servir como referência para avaliações futuras.

As médias de biomassa individual foram de 0,00415 Mg na parcela 1, 0,00389 Mg na parcela 2, 0,00521 Mg na parcela 3, 0,00393 Mg na parcela 4 e 0,00382 Mg na parcela 5. O teste de Kruskal–Wallis não indicou diferença significativa na distribuição da biomassa individual entre as parcelas (χ^2 = 8,4964; gl = 4; p = 0,075). Embora tenham sido observadas diferenças nos valores médios entre as parcelas, a ausência de diferença estatisticamente significativa indica que essas variações não foram suficientes para evidenciar diferenças na distribuição da biomassa individual entre os grupos avaliados. A variação observada entre as áreas, por sua vez, é compatível com a heterogeneidade entre locais descrita por Oberleitner *et al.* (2021), que observaram diferentes trajetórias de recuperação da biomassa entre florestas secundárias submetidas a distintas condições locais.

Figura 3 – Biomassa acima do solo (Mg ha^{-1}) estimada para as cinco parcelas da faixa sensível do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.

A estimativa da biomassa acima do solo depende também do modelo alométrico empregado, de modo que diferentes equações podem produzir valores distintos para uma mesma vegetação. Poorter *et al.* (2016), ao avaliar diferentes conjuntos de equações alométricas, observaram diferenças nas estimativas de biomassa, ressaltando que a escolha do modelo constitui uma fonte de variação na quantificação da biomassa e, consequentemente, dos estoques de carbono em florestas tropicais. Essa questão é especialmente relevante para florestas secundárias jovens e para indivíduos de pequeno porte. Liu *et al.* (2023), ao comparar diferentes equações alométricas em uma floresta secundária jovem, observaram que modelos previamente desenvolvidos para florestas tropicais apresentaram diferentes níveis de precisão e vieses quando aplicados a esse tipo de vegetação. Os autores destacaram que diferenças na estrutura do povoamento e na faixa de diâmetro dos indivíduos podem influenciar a adequação das equações utilizadas (Liu *et al.*, 2023; Poorter *et al.*, 2016).

Liu *et al.* (2023) também destacaram que a densidade da madeira constitui uma variável importante para a estimativa da biomassa em florestas secundárias jovens, uma vez que diferenças entre espécies e entre condições de desenvolvimento podem influenciar os valores estimados. Nesse contexto, a utilização de valores de densidade provenientes de bases de dados representa uma alternativa para inventários nos quais não há informações específicas para todos os indivíduos, mas pode introduzir fontes adicionais de variação quando os valores disponíveis não representam integralmente as características da vegetação estudada.

Além da escolha do modelo alométrico, outras etapas da estimativa podem contribuir para a incerteza da biomassa calculada. Réjou-Méchain *et al.* (2017) destacam que as estimativas de AGB podem incorporar incertezas associadas às medidas de diâmetro e altura, à atribuição da densidade da madeira e aos modelos utilizados no cálculo. Liu *et al.* (2023) também ressaltam a importância da densidade da madeira na estimativa de biomassa de florestas secundárias jovens e destacam que a utilização de valores médios provenientes de bancos de dados pode não representar completamente a variação observada na vegetação, especialmente quando existem diferenças entre espécies, ambientes e estágios sucessionais. Embora o pacote BIOMASS disponha de procedimentos específicos para a propagação dessas incertezas, a presente análise utilizou a função computeAGB() para obter as estimativas individuais, sem realizar essa etapa de propagação. Dessa forma, os valores apresentados devem ser interpretados como

estimativas pontuais de biomassa, sem uma quantificação específica da incerteza associada a cada estimativa (Réjou-Méchain *et al.*, 2017).

Estoque de carbono acima do solo

O estoque de carbono acima do solo foi calculado a partir da biomassa estimada. Não foram registrados indivíduos sem estimativa de carbono. O estoque individual variou de $3{,}32 \times 10^{-5}$ a 0,02135 Mg, enquanto o estoque total para os cinco conjuntos amostrados foi de 0,9512175 Mg. Por parcela, foram estimados 0,258 Mg de carbono na parcela 1, 0,169 Mg na parcela 2, 0,238 Mg na parcela 3, 0,132 Mg na parcela 4 e 0,155 Mg na parcela 5. Após a padronização para um hectare, os valores foram de 10,3 Mg ha^{-1} na parcela 1, 6,74 Mg ha^{-1} na parcela 2, 9,52 Mg ha^{-1} na parcela 3, 5,26 Mg ha^{-1} na parcela 4 e 6,20 Mg ha^{-1} na parcela 5 (Figura 4).

As médias de carbono individual foram de 0,00196 Mg na parcela 1, 0,00183 Mg na parcela 2, 0,00245 Mg na parcela 3, 0,00185 Mg na parcela 4 e 0,00180 Mg na parcela 5. O teste de Kruskal–Wallis apresentou o mesmo resultado obtido para a biomassa individual ($\chi^2 = 8{,}4964$; gl = 4; p = 0,075), logo, não indicou diferença significativa na distribuição.

Figura 4 – Estoque de carbono acima do solo (Mg ha^{-1}) estimado para as cinco parcelas da faixa sensível do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.

Conclusão

Os resultados permitiram estimar a biomassa acima do solo e o estoque de carbono dos indivíduos arbóreos presentes nas faixas sensíveis das cinco parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta. A biomassa total estimada para os 478 indivíduos foi de 2,01957 Mg, correspondendo a estoques de 11,2 a 21,9 Mg ha^{-1} entre as parcelas. A partir da fração de carbono de 0,471, foram estimados estoques de 5,26 a 10,3 Mg C ha^{-1}. As diferenças observadas entre as parcelas indicam variação nos valores estimados, enquanto o teste de Kruskal–Wallis não evidenciou diferença significativa na distribuição da biomassa individual entre as parcelas.

As relações positivas observadas entre DAP e altura e entre DAP e biomassa evidenciam a importância das características estruturais dos indivíduos para a estimativa da biomassa acima do solo. A utilização do modelo alométrico de Chave *et al.* (2014), associada ao DAP, à altura e à densidade da madeira, permitiu obter estimativas individuais de biomassa a partir dos dados disponíveis. A análise também evidenciou que a estimativa da biomassa está sujeita a fontes de incerteza relacionadas às medidas estruturais, à densidade da madeira e ao modelo alométrico empregado.

Os resultados devem ser interpretados considerando que a amostragem foi restrita às faixas sensíveis das cinco parcelas e aos indivíduos com DAP entre 1 e 10 cm, representando apenas uma parcela da estrutura arbórea existente na FLONA de Nísia Floresta. Além disso, não foi realizada a propagação formal das incertezas das

estimativas. Dessa forma, os valores obtidos constituem uma caracterização inicial da biomassa e do carbono da vegetação arbórea de pequeno porte nas áreas avaliadas.

A continuidade do monitoramento das parcelas poderá permitir comparações temporais e contribuir para compreender a dinâmica da biomassa e do carbono durante a regeneração florestal. A ampliação da amostragem e a incorporação de procedimentos de quantificação e propagação das incertezas também poderão aumentar a precisão das estimativas e fornecer uma caracterização mais abrangente dos estoques de biomassa e carbono na FLONA de Nísia Floresta.

Referências

CHAVE, J. et al. Improved allometric models to estimate the aboveground biomass of tropical trees. Global Change Biology, v. 20, n. 10, p. 3177–3190, 2014. DOI: https://doi.org/10.1111/gcb.12629. Acesso em: 02/05/2025.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Volume 4: Agriculture, Forestry and Other Land Use (AFOLU). Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme, EGGLESTON, H. S.; BUENDIA, L.; MIWA, K.; NGARA, T.; TANABE, K. (Eds.). IGES, Hayama, Japan, 2006. Disponível em: https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html. Acesso em: 02/05/2025.

FELDPAUSCH, T. R. et al. Height-diameter allometry of tropical forest trees. Biogeosciences, v. 9, p. 3381–3403, 2012. DOI: https://doi.org/10.5194/bg-9-3381-2012. Acesso em: 25/08/2026.

LIU, Bin; BU, Wensheng; ZANG, Runguo. Improved allometric models to estimate the aboveground biomass of younger secondary tropical forests. Global Ecology and Conservation, v. 41, p. e02359, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gecco.2022.e02359. Acesso em: 25/08/2026.

MORAES, Ana Paula Pinheiro et al. Estimativa do estoque volumétrico e acúmulo de biomassa e carbono em uma floresta ombrófila densa na Floresta Nacional de Carajás. Biodiversidade Brasileira, v. 15, n. 1, p. 13-24, 2025. DOI: https://doi.org/10.37002/biodiversidadebrasileira.v15i1.2655. Acesso em: 02/05/2025.

OBERLEITNER, Florian et al. Recovery of aboveground biomass, species richness and composition in tropical secondary forests in SW Costa Rica. Forest Ecology and Management, v. 479, p. 118580, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118580. Acesso em: 02/05/2025.

RÉJOU-MÉCHAIN, Maxime et al. BIOMASS: an R package for estimating above-ground biomass and its uncertainty in tropical forests. Methods in Ecology and Evolution, v. 8, n. 9, p. 1163-1167, 2017. DOI: doi: 10.1111/2041-210X.12753. Acesso em: 02/05/2025.

ZANNE, A. E. et al. Global wood density database. Dryad Digital Repository, 2009. DOI: https://doi.org/10.5061/dryad.234. Acesso em: 25/08/2026.

POORTER, L. et al. Biomass resilience of Neotropical secondary forests. Nature, v. 530, n. 7589, p. 211–214, 2016. DOI: https://doi.org/10.1038/nature16512. Acesso em: 25/08/2026.

Anexos



Figura 1 – Relação entre altura (cm) e diâmetro à altura do peito (DAP, cm) dos indivíduos arbóreos amostrados na faixa sensível das cinco parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.



Figura 2 – Relação entre diâmetro à altura do peito (DAP, cm) e biomassa acima do solo por indivíduo (Mg) dos indivíduos arbóreos amostrados na faixa sensível das cinco parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.



Figura 3 – Biomassa acima do solo (Mg ha^{-1}) estimada para as cinco parcelas da faixa sensível do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.



Figura 4 – Estoque de carbono acima do solo (Mg ha^{-1}) estimado para as cinco parcelas da faixa sensível do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.

CÓDIGO: SB1008

AUTOR: MARIA EDUARDA MATIAS DA SILVA

ORIENTADOR: JEFERSON DE SOUZA CAVALCANTE

TÍTULO: Efeito do DMT sobre os componentes do Sistema de Temporização Circadiano

Resumo

A Ayahuasca, bebida tradicionalmente utilizada por povos indígenas da América, é produzida a partir da combinação do cipó Banisteriopsis caapi com as folhas da Psychotria viridis. Seus princípios ativos atuam como agonistas no sistema serotoninérgico, as quais são vias essenciais na regulação do humor e do sono, induzindo alterações temporais, visuais e de memória. Por outro lado, o sistema de temporização circadiana organiza a ritmicidade biológica em ciclos de cerca de 24 horas. Em roedores, essa rede é coordenada pelo Núcleo Supraquiasmático (NSQ) no hipotálamo — considerado o principal marca-passo central — e pelo Folheto Intergeniculado (FIG) no tálamo, que integra informações fóticas e não fóticas. Diante do crescente interesse nas propriedades desses compostos, a pesquisa tem como objetivo central investigar os efeitos da administração periódica da Ayahuasca sobre o padrão de sono-vigília e a mobilidade dos animais. Além dos aspectos comportamentais, o trabalho busca identificar possíveis alterações morfológicas e neuroquímicas nos tratos retinohipotalâmico e geníclo-hipotalâmico, bem como nas vias serotoninérgicas provenientes dos núcleos da Rafe.

Palavras-chave: Psicodélicos. Ayahuasca. Cronobiologia. Núcleo Supraquiasmático

TITLE: Effect of DMT on the Components of the Circadian Timing System

Abstract

Ayahuasca, a beverage traditionally used by Indigenous peoples of the Americas, is prepared from the combination of the vine Banisteriopsis caapi and the leaves of Psychotria viridis. Its active ingredients act as agonists in the serotonergic system—essential pathways for mood and sleep regulation—inducing temporal, visual, and memory alterations. On the other hand, the circadian timing system organizes biological rhythmicity in cycles of approximately 24 hours. In rodents, this network is coordinated by the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) in the hypothalamus—considered the primary central pacemaker—and by the Intergeniculate Leaflet (IGL) in the thalamus, which integrates photic and non-photic information. Given the growing interest in the

properties of these compounds, this study aims to investigate the effects of periodic Ayahuasca administration on the sleep-wake pattern and mobility of the animals. Beyond behavioral aspects, the research also seeks to identify potential morphological and neurochemical alterations in the retinohypothalamic and geniculohypothalamic tracts, as well as in the serotonergic pathways originating from the Raphe nuclei.

Keywords: Psychedelics. Ayahuasca. Chronobiology. Suprachiasmatic Nucleus

Introdução

Ao longo da formação histórica e social, observou-se a crescente utilização de substâncias psicodélicas, com destaque para a Ayahuasca — bebida ancestral amplamente utilizada por povos indígenas americanos, obtida a partir do cipó Banisteriopsis caapi combinado com as folhas do arbusto Psychotria viridis. A junção desses componentes promove uma ação agonista no sistema serotoninérgico, o qual é responsável por diversas funções comportamentais e fisiológicas, tais como a regulação do humor e do sono. Dessa forma, substâncias que atuam nos receptores de serotonina produzem efeitos diversos, incluindo alterações na percepção temporal, visual, de realidade e no processamento da memória. Paralelamente, o sistema de temporização circadiana é responsável pela geração de ritmos e pela sincronização das atividades biológicas em um período de aproximadamente 24 horas, tendo a luz como sua principal pista ambiental (zeitgeber). Em roedores, modelo animal utilizado neste estudo, esse sistema é composto pelo Núcleo Supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo, e pelo Folheto Intergeniculado (FIG), situado no tálamo, além de vias sincronizadoras e efetores comportamentais. Com base em pesquisas prévias, o NSQ é consolidado como o principal marca-passo circadiano em mamíferos, visto que lesões nessa estrutura promovem a perda da ritmicidade, a qual é restabelecida após o transplante da região. Por sua vez, o FIG integra o trato genículo-hipotalâmico e contém células imunorreativas ao neuropeptídeo Y (NPY), configurando uma via indireta de transmissão da informação luminosa (fótica e não fótica). Considerando os conhecimentos da cronobiologia, e o interesse crescente no potencial terapêutico e neurológico de psicodélicos naturais, este estudo tem como objetivo verificar como a administração periódica do chá de Ayahuasca influencia o ciclo de sono-vigília e a mobilidade dos animais submetidos a essa substância. Além disso, a pesquisa busca avaliar possíveis alterações morfológicas e/ou neuroquímicas no trato retinohipotalâmico, no trato genículo-hipotalâmico e nas projeções serotoninérgicas oriundas dos núcleos da Rafe.

Metodologia

Teste de Atividade Locomotora (Campo Aberto). Neste aparato o animal será exposto a situações conflituosas, como por exemplo a exposição ao ambiente novo, onde sua motivado a exploração é testada, e adicionado a isso, o fato do ambiente ser aberto, cujo conflito ocorre no histórico comportamental da espécie, a qual evita se expor a ambientes abertos (Prut e Belzung, 2003). O teste será realizado usando um aparato circular de madeira medindo (60x40), dividido em área interna e área externa. Uma câmera será colocada acima do aparato e conectada a um computador, contendo um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA) será usada com a

finalidade de registro comportamental. Assim, os animais serão colocados no centro do aparato, em uma única sessão de 10 minutos, e os seguintes comportamentos serão avaliados: (1) distância total percorrida (m), (2) velocidade média (m/s) e (3) tempo de permanência em cada subárea (s). Cada animal será avaliado separadamente e entre os testes, o aparato será limpo com álcool 5%. Adicionado a isso, será realizado imunohistoquímica para correlacionar os comportamentos à mudança neuroquímicas nos tratos associados ao ciclo sono-vigília.

Resultados e Discussões

Pesquisa em andamento

Conclusão

pesquisa em andamento

Referências

Osório FL, Sanches RF, Macedo LR, Santos RG, Maia-de-Oliveira JP, Wichert-Ana L. 2015. 2015. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. Rev. Bras. Psiquiatr. 37:13-20. Pontes ALB, Engelberth RCGJ, Nascimento Jr ES, Cavalcante JC, Costa MSMO, Pinato L, Toledo CAB, Cavalcante JS. 2010. Serotonin and circadian rhythms. Psych & Neurosc 3(2):217-228. Prochazkova L, Lippeit DP, Colzato LS, Kuchar M, Sjoerds Z, Hommel B. 2018. Exploring the effect of microdosing psychedelics on creativity in an open-label natural setting. Psychopharmacology 235:3401-3413. Rapport M, Green A, Page I. 1948b. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. J Biol Chem 174:735-741. Rea MA, Glass JD, Colwell CS. (1994). Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. Journal of Neuroscience, 14, 3635-3642. Riba J, Valle M, Urbano G, Yritia M, Morte A, Barbanoj MJ. 2003. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. J. Pharmacol. SCHWARTZ, James H; KANDEL, Eric R; JESSELL, Thomas M. Principios de neurociencia. Madrid Etc: Mcgraw-Hill-Interamericana, D.L, 2014.

CÓDIGO: SB1019

AUTOR: GABRIEL ANDRADE SOUSA

ORIENTADOR: IURI GOULART BASEIA

TÍTULO: Diversidade de fungos gasteroides para a Floresta Nacional de Nísia Floresta

Resumo

Os fungos são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, que apresentam grande importância ecológica, alimentícia e biotecnológica. Os fungos gasteroides são um grupo polifilético do Filo Basidiomycota, caracterizados pelo desenvolvimento angiocárpico e dispersão passiva dos esporos. O Brasil abriga o Domínio da Mata Atlântica, um *hotspot* de biodiversidade, que inclui a diversidade fúngica, e é protegido por Unidades de Conservação, como a Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta, local de coleta do presente estudo. Foram realizadas coletas de fungos gasteroides na FLONA e analisados no Laboratório de Biologia de Fungos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), resultando na identificação de seis espécies: *Cyathus* aff. *earlei* Lloyd; *Cyathus triplex* Lloyd; *Phallus purpurascens* T.S. Cabral, B.D.B. Silva & Baseia; *Clathrus natalensis* G.S. Medeiros, Melanda, T.S. Cabral, B.D.B Silva & Baseia; *Geastrum neoamericanum* J.O. Sousa, Accioly, M.P. Martín & Baseia; *Geastrum fimbriatum* Fr. Adicionalmente, foram realizadas atividades de educação ambiental em conjunto com a equipe técnica do ICMBio, na Escola Estadual Nísia Floresta.

Palavras-chave: Clathraceae, Geastraceae, Nidulariaceae, Phallaceae, Mata Atlântica.

TITLE: Gasteroid fungi diversity in Nísia Floresta National Forest

Abstract

Fungi are organisms belonging to the Kingdom Fungi, which hold great ecological, nutritional, and biotechnological importance. Gasteroid fungi represent a polyphyletic group within the phylum Basidiomycota, characterized by angiocarpic development and passive spore dispersal. Brazil shelters the Atlantic Rainforest Domain, a biodiversity

hotspot that includes these fungi and is protected by Conservation Units such as the National Forest (FLONA) of Nísia Floresta, the collection locality of the present study. Gasteroid fungi were collected in the FLONA and analyzed at the Fungal Biology Laboratory (Laboratório de Biologia de Fungos) of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), resulting in the identification of six species: *Cyathus* aff. *earlei* Lloyd; *Cyathus triplex* Lloyd; *Phallus purpurascens* T.S. Cabral, B.D.B. Silva & Baseia; *Clathrus natalensis* G.S. Medeiros, Melanda, T.S. Cabral, B.D.B. Silva & Baseia; *Geastrum neoamericanum* J.O. Sousa, Accioly, M.P. Martín & Baseia; and *Geastrum fimbriatum* Fr. Additionally, educational activities were conducted in collaboration with the technical team of ICMBio at the Nísia Floresta State School (Escola Estadual Nísia Floresta).

Keywords: Atlantic Rainforest,Clathraceae,Geastraceae, Nidulariaceae, Phallaceae

Introdução

Os fungos são organismos do domínio Eukarya, pertencentes ao Reino Fungi (Ainsworth, Sparrow, Sussman, 1977). Esses organismos são importantes agentes ecológicos, pois atuam na formação de micorrizas, que são relações mutualísticas com plantas, e participam na ciclagem de matéria orgânica, utilizando diversos substratos no ambiente, como folhas e madeira em decomposição (Alexopoulos, 1996). Além disso, apresentam relevância biotecnológica na indústria farmacêutica com a produção de compostos bioativos como a ciatina, molécula com potencial antioxidante e antibiótico, e potencial na indústria alimentícia, como a fermentação na produção de bebidas ou com corpos de frutificação comestível (Boa, 2004; Dixon *et al*, 2011; Dore-Guerra *et al*; Kang *et al*, 2007).

Durante a reprodução sexuada e dispersão dos esporos, os fungos Basidiomycota desenvolvem formas macroscópicas denominadas de corpos de frutificação, basidiocarpo ou basidioma (Raven, Evert, Ecchorn, 2001). Dentre essas formas, está o grupo polifilético “gasteroide”, caracterizados pela dispersão passiva dos esporos, a **estatismosporia**, após seu **desenvolvimento angiocárpico**, ou seja, a maturação dos esporos internamente no basidioma (Miller & Miller, 1988; Alexopoulos,1996). A maior parte dos táxons de Basidiomycota dispersam os esporos ativamente, por possuírem o apêndice hilar (Alexopoulos, 1996). Essa estrutura localiza-se na base do basidiósporo e infla com líquidos até explodir e gerar uma força que o impulsiona para longe do basidioma (Webster & Weber, 2007). Contudo, nos fungos gasteroides esse mecanismo não ocorre, pois seus basidiósporos são produzidos no interior do basidioma fechado e não apresentam apêndice hilar. Com isso, esses fungos desenvolveram diferentes estratégias de **estatismosporia**, que liberam os esporos passivamente e dependem de agentes externos para sua dispersão (Miller & Miller, 1988). Entre essas estratégias, a gleba pulverulenta pode ser dispersa pelo vento, como ocorre nas estrelas-da-terra e puffballs (Sunhede, 1974). Em outros grupos, a gleba é organizada nos chamados peridíolos, cuja dispersão depende do impacto das gotas de chuva, como observado em Nidulariaceae Dumort. (Brodie, 1951). Há ainda fungos que produzem uma gleba mucilaginosa, rica em açúcares e de odor intenso, capaz de atrair insetos que atuam como agentes de dispersão, como ocorre em representantes de Phallales E. Fisch. (Tuno,

1998).

Estruturalmente, esses fungos possuem uma camada estéril, o **perídio**, e uma porção fértil, a **gleba**. O perídio pode ser estratificado e apresentar diversas formas, como formato estrelado em *Geastrum* Pers. (fungo estrela-da-terra), infundibuliforme em *Cyathus* Haller (fungo ninho-de-pássaro), ou manter-se persistente na base do basidiocarpo expandido como ocorre em Phallales E. Fisch. (Sunhede, 1989; Brodie, 1975; Alexopoulos,1996). A porção fértil é composta por esporos e hifas estruturais (os capilícios), podendo ser pulverulenta, mucilaginosa ou estar contida em pequenas estruturas, como os peridíolos em *Cyathus* Haller (Webster & Weber, 2007). Os fungos gasteroides, possuem ampla distribuição pelo Brasil, ocorrendo em todas as regiões geográficas do país (Lima, 2018). O Brasil abriga o Domínio da Mata Atlântica, reconhecido como um dos *hotspot*de biodiversidade líderes em termos endemismo (Myers, 2000). No país, para a preservação da diversidade biológica e meio ambiente, existem as Unidades de Conservação (UC) que estão sob regimento do Sistemas Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), que tem como alguns de seus objetivos a educação ambiental, propiciar meios para a pesquisa científica e contribuir com a manutenção, conservação e restauração da biodiversidade (Brasil, 2000). Nesse contexto, a Floresta Nacional de Nísia Floresta é uma UC que ampara um fragmento de mata do Domínio da Mata Atlântica, uma área crítica para a conservação e, por conseguinte, dos fungos gasteroides, em que se objetivou a realização do presente estudo (ICMBio, 2012).

Metodologia

ÁREA DE COLETA

A área de estudo foi a Floresta Nacional de Nísia Floresta (S 06º05’12,4’’, W 035º11’04,0’’), localizada no município de Nísia Floresta, no estado do Rio Grande do Norte. Essa região florestal possui um histórico de exploração e interferência antrópica, referente a anos de desmatamento e plantação de cana de açúcar, e posteriormente, nas décadas de 60 e 70, ocorreram várias experimentações florestais na FLONA, devido à sua condição de Estação Florestal de Experimentação (EFLEX). Por esse conjunto de fatores, partes da vegetação nativa da Unidade de Conservação (UC) estão em estágio médio de regeneração. A UC encontra-se no Domínio da Mata Atlântica, e é composta pelas formações vegetais Floresta Estacional Semidecidual e Tabuleiro Litorâneo, que equivalem a 45,22% e 14,11% da área total da reserva, respectivamente. Além disso, existem as áreas em que ocorreu experimentação florestal, correspondente a 39,7%, e a área social-administrativo (0,97%). A temperatura média anual da região é de 26° C, com um período de seca que pode durar de seis a nove meses, e uma pluviometria média anual de 1.455 mm. O solo é arenoso, pobre em macro e micronutrientes, com um relevo inferior a 100 metros de altitude em relação ao nível do mar (ICMBio, 2012).

COLETA

Foram realizadas duas coletas nos meses de março e junho de 2025 na FLONA de Nísia Floresta, seguindo a metodologia de coleta padrão para fungos gasteroides, descrita por Silva *et al*. (2014). Foram percorridas trilhas pré-existentes e adentrando a mata quando necessário, observando substratos propícios para o desenvolvimento desses fungos como folhiço, solo e madeira em decomposição. O material encontrado foi fotografado em campo em diferentes ângulos, utilizando uma régua metálica como referência para as dimensões do basidioma fresco. Também foram registradas características macromorfológicas e ecológicas, como hábito, incidência luminosa, coloração, substrato e presença de insetos, além das coordenadas geográficas, utilizando um aparelho de GPS. Para a determinação da coloração dos basidiomas, foi utilizado a carta de cores de Kornerup & Wanscher (1978). Para cada espécime, foram registrados o nome e o número do coletor. Após isso, com auxílio de canivete, o material foi coletado junto com parte do substrato, com cuidado para manter sua integridade e coletar estruturas mais sensíveis como volva e rizomorfa, que podem estar abaixo do substrato. Em seguida, o basidioma foi armazenado em uma caixa plástica compartimentalizada e levado para desidratadora elétrica, a temperatura de 40°C até a observação da secagem completa do material, esse tempo varia de acordo com as dimensões do basidioma e do tipo de substrato coletado. O material seco foi armazenado em sacos plásticos herméticos.

ANÁLISES MORFOLÓGICAS

O material herborizado foi analisado no Laboratório de Biologia de Fungos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LBF-UFRN). As análises macromorfológicas foram realizadas observando o basidioma a olho nu e com auxílio de microscópio estereoscópico Leica EZ4 e Nikon SMZ1500 com câmera acoplada Nikon DS-Ri1. Foram avaliados tamanho, cor, formato, textura, consistência, estruturas incomuns ou específicas para cada gênero. Também foram analisadas as diferentes estruturas e partes do basidioma, incluindo as camadas do perídio, o estipe, o pedicelo, os raios do exoperídio e a gleba.

Para as análises micromorfológicas foram preparadas lâminas das diferentes estruturas e camadas. Para o preparo das lâminas, pequenas partes do material seco foram fragmentadas o máximo possível com auxílio de pinça, lâmina de barbear e agulha em lâminas com solução de hidróxido de potássio (KOH) a 5%, ou utilizando corantes azul de algodão, Melzer e vermelho congo e observado em microscópio óptico Nikon Eclipse Ni com câmera acoplada Nikon Ds-Ri. Foram realizadas 30 medições de cada estrutura analisada, além de avaliar sua cor, formato, presença e ausência de poros, septos, incrustações, ornamentações e grampos de conexão. Para avaliar o formato dos esporos e outras estruturas globosas foram calculados a média e o desvio padrão, bem como a razão média entre a largura e altura (Qm).

O processo de análise e identificação das exsicatas apresenta particularidades para cada grupo. Com isso, a metodologia descrita anteriormente foi baseada nas informações e procedimentos apresentados por Brodie (1975), Miller & Miller (1988), Silva *et al*.

(2014) e Sunhede (1989). Para a identificação das espécies foram utilizadas chaves de identificação específicas para cada gênero. Em sua ausência foram consultados protólogos, descrições originais e registros de espécies, priorizando-se referências bibliográficas que apresentassem registros de ocorrência no Brasil. Foram utilizadas as chaves de identificação presentes em Cabral *et al* (2019), para *Phallus* Junius ex L.; Góis *et al* (2021), para *Cyathus* Haller; Sousa *et al* (2014), para *Geastrum* Pers.

Resultados e Discussões

Foram analisados 60 basidiomas de fungos gasteroides, os quais corresponderam a 4 gêneros distintos e 6 espécies:

Cyathus aff. *earlei* Lloyd.

Perídio infundibuliforme, 6,63 – 8,11 mm de altura × 6,08 – 9,83 mm de largura, não expandido na boca, não pedicelado. Embasamento marrom avermelhado a marrom escuro (8E4 – 8F4) conspícuo, 3,76 mm de comprimento × 2,53 mm de largura, liso. Exoperídio hirsuto, marrom escuro (6F7), com tomentos de 0,33 – 0,44 mm, de mesma cor, arranjados em tufos regularmente direcionados para fora da frutificação, flexíveis. Parede externa lisa. Margem da boca marrom acinzentada (8F3), finamente fimbriada em padrão contínuo,0,21 – 0,35 mm de altura. Endoperídio,marrom escuro a marrom acinzentado (6F3 – 6F4), inconspicuamente plicado, com 0,37 – 0,55 mm de espaçamento entre as plicações. Brilho perceptível, contrastando com o exterior. Estipe marrom escuro a negro (6F3 – 6F4), 1,32 mm de altura e 1,84 mm de comprimento. Epifragma, flexível, da mesma cor do basidioma. Peridiolodo, marrom acinzentado (8E2), 2,03 – 2,38 mm de comprimento × 1,75 – 2,09 mm de largura, angular a elíptico, de superfície lisa, túnica levemente amarelada ou hialina, córtex duplo, com exocórtex e endocórtex negros, e mesocórtex com hifas compactadas, pulverulentas e esbranquiçadas. Basidiósporos lisos, hialinos, 14,48 – 17,71 µm de comprimento × 8,12 – 10,70 µm de largura (L= 15,93; W= 9,66), elipsóide a alongado (Q = 1,46 – 1,96), em média alongado (Qm= 1,65), comuns, apículo presente em alguns,e paredes de 1,61 – 2,48 mm.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, Flona de Nísia Floresta, março de 2025

Comentários: Segundo Góis *et al* (2021) os espécimes brasileiros identificados como *Cyathus earlei* apresentam características diferentes do tipo da espécie, sugerindo que se trata de um complexo de espécies. Foi observado no presente material características semelhantes ao morfotipo descrito por Góis *et al* (2021) com basidiomas que alcançam 9 mm de altura × 8 mm de largura, embasamento superior a 3 mm de largura, tomentos do exoperídio superiores a 5 mm de comprimento, córtex do peridíolo duplo por toda sua extensão e basidiósporos em média elípticos (Qm = 1,55) e com dimensões médias de

15,8 µm × 10,03 µm, que se diferencia do material tipo principalmente pela presença do córtex duplo.

Cyathus triplex Lloyd

Perídio infundibuliforme, 4,41 – 5,46 mm de altura × 6,39 – 7,37 mm de largura, não expandido na boca, não afilado na base, sem formação de pedicelo, com incrustações em alguns basidiomas. Embasamento marrom escuro (7F5), conspícuo, 2,68 mm de comprimento × 3,65 mm de largura, cotonoso. Exoperídio marrom escuro (6F5), hirsuto, com tomentos arranjados em tufos, regularmente direcionados para fora do basidioma, rígidos, 0,23 – 0,40 mm de comprimento.Margem da boca marrom acinzentada (8F3), finamente fimbriada, de padrão contínuo, 0,20 – 0,38 mm de comprimento. Parede externa inconspicuamente plicada, 0,45 – 0,88 mm de espaçamento entre as plicações. Endoperídiomarrom (6E4), liso a inconspicuamente plicado, 0,34 – 0,54 mm de espaçamento entre as plicações, com brilho perceptível, contrastando com o exterior. Estipe marrom claro (5D4), 0,22 mm de altura × 0,73 mm de largura. Epifragma não presente no material. Peridíolo cinza amarronzado (9F2), 1,31 – 1,81 mm de comprimento × 1,51 – 1,81 mm de largura, circular a angular, liso a levemente enrugado, túnica ausente, córtex duplo, levemente achatado no topo e na base, porém não o suficiente para ser considerado duplo subhomogêneo simples, endocórtex e exocórtex negros, mesocórtex branco, compactado e pulverulento. Basidiósporos lisos, hialinos, 13,33 – 16,82 µm de comprimento × 7,93 – 11,58 µm de largura (L= 15,17; W= 9,81), levemente elíptico a alongado (Q= 1,26 – 1,96), em média elipsoide (Qm= 1,56), apículo presente em alguns, e paredes de 1,92 – 3,13 µm de espessura.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, Flona de Nísia Floresta, Parcela 2, março de 2025

Hábito: Crescimento gregário, epígeo, em madeira em decomposição.

Comentários: *Cyathus triplex* apresenta uma variação morfológica entre os registros brasileiros, notável nas dimensões dos basidiósporos, 18,86 µm × 12,41 µm em Cruz (2017), 18,33 µm × 14,23 µm em Góis *et al* (2021) e 15,97 µm × 9,60 µm em Medeiros *et al* (2025), com o presente material possuindo tamanho e largura próximos ao descrito por Medeiros *et al* (2025), que analisou exsicatas advindas da Flona de Nísia Floresta. *Cyathus triplex* assemelha-se a *C. earlei* devido coloração amarronzada, exoperídio hirsuto e endoperídio liso a inconspicuamente plicado, mas diferencia pelo tamanho reduzido do basidioma menor que 8 mm e tomentos menores que 0,5 mm.

Phallus purpurascens T.S. Cabral, B.D.B. Silva & Baseia

Basidioma imaturo branco (1A1), globoso, de textura coriácea, 4,0 cm de altura × 4,2 cm de largura. Basidioma fresco expandido 19,9 cm de altura. Receptáculo campanulado, 4,6 cm de altura × 4,8 cm de comprimento, fortemente reticulado, com abertura apical circular. Pseudoestipe cilíndrico, branco, esponjoso, 15,3 cm de altura × 3,2 cm de largura. Indúsio branco (1A1),pouco desenvolvido (extensão menor que ⅔ do basidioma) 5,4 mm de comprimento × 8,7 cm de largura. Volva papirácea, branca em sua maioria se tornando violeta pálido (1A1 – 15A3), com porções púrpuras. Rizomorfa se tornando violeta pálido (1A1 – 15A3), com 1 cm de comprimento. Pseudoestipe composto por hifas hialinas, 22,35 – 40,91 µm de altura × 17,12 – 36,03µm de largura, ovais a elípticas, de parede espessa (>1µm), 1,02 – 1,72 µm de espessura. Volva composta por hifas hialinas, filamentosas, com grande variação no diâmetro, 3,44 – 6,67 µm de diâmetro, parede fina a espessa, 0,70 – 1,67 µm de espessura, não incrustada, retas, com presença de cristais de células globosas. Esporos hialinos, lisos, 2,4 – 4,18 µm de altura × 1,22 – 2,45 µm de largura, elípticos (Qm= 2,67; Q= 1,51 – 2,67), as paredes não foram medidas.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, Flona de Nísia Floresta, junho de 2025

Hábito: crescimento solitário; sobre o solo, próximo ao folhiço.

Comentários: *Phallus purpurascens*, é um *Phallus* com indúsio, estrutura semelhante a um véu. Os fungos desse gênero com essa característica eram facilmente identificados como *Phallus indusiatus*, que gerou um complexo de espécies, posteriormente estudado por Cabral *et al.* (2019). Dentre as espécies brasileiras de *Phallus* com indúsio, *Phallus purpurascens* é facilmente identificada pela grande dimensão de seu basidioma, que alcança facilmente 20 cm, receptáculo fortemente reticulado e a coloração púrpura em sua volva e rizomorfa (Cabral *et al.*, 2019). Além disso, o presente material é de grande importância taxonômica, por representar o primeiro registro para a região Nordeste.

Clathrus natalensis G.S. Medeiros, Melanda, T.S. Cabral, B.D.B Silva & Baseia

Basidioma imaturo ausente. Basidioma expandido fresco 11,8 cm de altura × 6,4 cm de largura, composto por braços brancos (1A1), com 3 tubos, esponjosos, arranjados em formas geométricas de pentágonos e hexágonos. Gleba negra, mucilaginosa, de odor fétido, disposta na região interna dos braços sem formar glebíferos bem definidos. Pseudoestipe ausente. Rizomorfa branca (1A1), observada após a secagem do material. Volva amarelo palha (3B4)não observada após a secagem do material.

Hifas do braço globosas a alongadas, 20,84 – 43,69 µm de comprimento × 15,84 – 30,64 µm de largura, hialinas, de parede fina. Esporos de parede fina, hialinos, cilíndricos 4,08 – 5,17 µm de comprimento × 1,40 – 2,34 µm de largura [χ= 4,61 ± 0,29 µm × 1,87 ± 0,23 µm, Qm= 2,50 n=30].

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, Flona de Nísia Floresta, junho de 2025.

Hábito: Crescimento solitário em solo com serrapilheira.

Comentários: Existem apenas dois registros de *Clathrus natalensis* na ciência. O primeiro registro feito por Crous *et al.* (2018) do holótipo da espécie, que possui basidioma grande, avermelhado, de braços robustos e com a gleba espalhada pelo interior dos braços. O segundo registro, realizado por Oliveira *et al.* (2023), que descreve um espécime de basidioma grande, esbranquiçado, braços que afinam no topo e de mesma característica da gleba. O presente material apresenta características semelhantes a ambos os registros, como coloração esbranquiçada e braços robustos, além das medições das microestruturas serem semelhantes ao holótipo. *C. natalensis* se assemelha a *Clathrus chrisomycelinus* Möller, mas se diferencia, pois esse último possui basidioma menor e glebíferos bem definidos na intersecção dos braços.

Geastrum neoamericanum J.O. Sousa, Accioly, M.P. Martín & Baseia

Basidioma imaturo epígeo, branco (1A1), citriforme a lacriforme, 05 – 07 mm de altura × 07 – 09 mm de largura, ápice umbunado, superfície não incrustada, cotonosa, enrugada. Subículo branco, cotonoso. Rizomorfa ausente. Basidioma expandido sacado, 9 mm de altura (incluindo peristômio) × 11 mm de largura, 05 raios por basidioma, revolutos, não higroscópico. Camada micelial Branco a branco alaranjado (5A1 a 5A2), superfície não incrustada, cotonosa, persistente. Camada fibrosa branco amarelado (2A2), cotonosa. Camada pseudoparenquimatosa marrom claro (6D4), persistente, colar ausente. Endoperídio subgloboso, 07 mm de altura × 06 mm de largura, séssil, glabro, não pruinoso. Pedicelo e hipófise ausente. Peristômio, fimbriado, delimitado, deprimido sob o basidioma, impossibilitando a medição.

Basidiósporos amarronzados, subgloboso, 3,14 – 3,93 × 3,12 – 3,88 µm [χ= 3,68 ± 0,18 × 3,56 ± 0,18 µm, n=30], globosos (Qm=1,03). Capilícios, castanho claro, 2,01 – 3,08 µm de diâmetro, verrucosa, reta, não ramificada. Camada micelial hialina, 3,96–9,9 µm de diâmetro, composta por hifas hialinas de paredes finas a espessas, 0,99 – 2,97 µm de espessura, não incrustada, sinuosa, ramificada, com lúmen evidente. Camada fibrosa, composto por hifas hialinas, de parede espessa (<1 µm), 2,97 – 4,95 µm de diâmetro, de superfície levemente incrustada, sinuosa, com lúmen visível. Camada pseudoparenquimatosa castanho claro, 23,70 – 58,21 µm de comprimento × 20,08 – 38,97µm de largura, subglobosa a ovoide, com algumas células irregulares, de parede fina a espessa, 0,86 – 2,58 µm.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, Flona de Nísia Floresta, março de 2025.

Hábito: Crescimento gregário, sobre subículo recobrindo madeira em decomposição.

Comentários: Ao correr a chave de para espécies de *Geastrum* Pers., proposta por Sousa *et al.* (2014), o material foi identificado como *Geastrum schweinitzii* (Berk. & M.A. Curtis) Zeller. Accioly *et al.* 2019 desenvolve *G. schweinitzii* como um complexo de

espécies e descreve *G. baculicrystallum* e *G. neoamericanum*, duas espécies semi-crípticas com *G. schweinitzii*, que apresentam morfologia muito semelhante nos caracteres macro e micromorfológicas, mas podem ser diferenciados pelo formato da columela, com *G. neoamericanum* possuindo columela clavada e *G. baculicrystallum* columela ampuliforme.

Geastrum fimbriatum Fr.

Basidioma imaturo, subículoe rizomorfa ausentes. Basidioma expandido saculiforme, 9 – 11 mm de altura (com peristômio) × 27 – 35 mm de largura, 04 a 06 raios por basidioma, involutos e revolutos, higroscópicos. Camada micelial loiro escuro (5D4) desprendendo de forma irregular, presente em alguns pontos no basidioma expandido, cotonosa e incrustada quando presente. Camada fibrosa papirácea, amarelo pálido (4A3). Camada pseudoparenquimatosa marrom escuro (7F4), soltando na base dos raios, colar ausente. Endoperídio globoso a depressogloboso, marrom (5E4), 8 – 10 mm de altura × 11 – 12 mm de largura, séssil, com hifas protuberantes, não pruinoso. Pedicelo e hipófise ausente. Peristômio da mesma cor do endoperídio, fibriloso, não delimitado, mamiforme, 1 mm de altura.

Basidiósporos âmbar, globoso a subglobosos, 3,46 – 5,63 × 3,42 – 5,28 µm [χ= 4,35 ± 0,46 × 4,19 ± 0,44 µm, Qm=1,04, n=30]. Capilícios, castanho claro, 2,95 – 5,23 µm de diâmetro, verrucosa, não ramificada, não sinuosa, lúmen não evidente. Camada micelial hialina, 2,06 – 3,48 µm de diâmetro, paredes finas a espessas 0,71 – 1,27 µm, não incrustada, sinuosa, ramificada, de lúmen evidente. Camada fibrosa hialina, 3,63 – 9,5 µm de diâmetro, parede espessa 1,28 – 3,81 µm de espessura, de superfície incrustada, levemente sinuosa e ramificada de lúmen evidente. Camada pseudoparenquimatosa hialina, 41,02 – 71,21 µm de comprimento × 26,17 – 65,77µm de largura, elipsoide a irregular, de parede espessa, 1,03 – 2,35 µm.

Material analisado: Brasil, Rio Grande do Norte, Nísia Floresta, Flona de Nísia Floresta, março de 2025

Hábito: Crescimento gregário.

Comentários: Ao correr a chave de para espécies de *Geastrum* Pers., proposta por Sousa *et al*. (2014), o material foi identificado como *Geastrum fimbriatum*. *G. fimbriatum* apresenta morfologia similar a *G. rusticum* Baseia, B.D.B. Silva & T.S. Cabral, mas pode ser diferenciado, principalmente, por possuir hifas protuberantes no corpo do endoperídio.

A educação ambiental de qualidade é uma importante ferramenta para a conservação, capaz de desenvolver uma população hábil a trabalhar na resolução e prevenção de problemas ambientais (Kassas, 2002). Contudo, dentro dos espaços formais de ensino, o

conhecimento sobre o Reino Fungi ainda é muito defasado, com muitas espécies fúngicas sendo confundidas com plantas, que denota a fraqueza no sistema de ensino em relação ao grupo (Costas *et al.*, 2024). Nesse contexto, adicionalmente, os esforços do presente estudo resultaram em ações de educação ambiental na Escola Estadual Nísia Floresta. A equipe técnica da FLONA de Nísia Floresta realiza atividades educativas para a população local, e de cidades próximas, dentro dos limites da Unidade de Conservação (UC) ou em escolas da região (ICMBio, 2012). Assim, durante as coletas na UC, o grupo de pesquisa foi convidado a participar destas atividades e palestra sobre fungos para os alunos da escola.

Conclusão

O presente estudo resultou na coleta de seis espécies de fungos gasteroides *Cyathus aff. earlei, Cyathus triplex, Phallus purpurascens, Clathrus natalensis, Geastrum neoamericanum* e *Geastrum fimbriatum*. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da riqueza fúngica da Unidade de Conservação e reforçam a importância da realização de inventários taxonômicos nessas áreas. Dentre esses, foi constatado o primeiro registro no Nordeste para *P. purpurascens*, espécie reconhecida após a revisão de um complexo de espécies. Estudos que geram novos registros evidenciam a necessidade da contínua realização de pesquisas em Unidades de Conservação, para a descoberta de espécies novas e novas ocorrências de espécies conhecidas. Essa necessidade é particularmente relevante na região estudada, que apresenta um fragmento do Domínio da Mata Atlântica, considerado um hotspot de biodiversidade.

Além dos resultados taxonômicos, o estudo possibilitou o desenvolvimento de ações de educação ambiental em conjunto com a equipe técnica do ICMBio, contribuindo para aproximar a academia da sociedade e fortalecer a relação entre pesquisa científica e conservação. Contudo, a educação ambiental, especialmente acerca do Reino Fungi, ainda é muito defasada, que demonstra necessidade de ações de extensão focadas no grupo. Essas iniciativas podem contribuir para aumentar a compreensão da sociedade sobre a diversidade, a importância ecológica e o papel dos fungos na manutenção dos ecossistemas.

Referências

ACCIOLOY, T. *et al*. Hidden fungal diversity from the Neotropics: *Geastrum hirsutum*, *G. schweinitzii* (Basidiomycota, Geastrales) and their allies. PLoS ONE 14(2): e0211388, 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211388.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. 4. ed. New York: John Wiley, 1996.

BOA, E. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. ISBN: 92-5-105157-7.

BRASIL. Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.htm. Acesso em: 8 ago. 2026.

BRODIE, H.J. The splash-cup dispersal mechanism in plants. Canadian Journal of Botany 29: 224–234, 1951.

BRODIE, H.J. The Bird's Nest Fungi. Canada: University of Toronto Press, 1975. 199 p.

CABRAL, T.S. *et al*. Behind the veil – exploring the diversity in *Phallus indusiatus* s.l. (Phallomycetidae, Basidiomycota). MycoKeys 58: 103–127, 2019. https://doi.org/10.3897/mycokeys.58.35324.

COSTA, A.S.; SANTANA, M.D.F.; CANTO, E.S.M. Percepção de alunos de ensino médio de uma escola pública paraense sobre os fungos gasteroides (Basidiomycota). Revista JRG de Estudos Acadêmicos 7(14): e141064, 2024. https://doi.org/10.55892/jrg.v7i14.1064.

CROUS, P.W. *et al*. Fungal Planet description sheets: 785–867. Persoonia 41: 238–417, 2018. https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.12.

CRUZ, Rhudson Henrique Santos Ferreira da. Revisão morfológica e molecular do gênero *Cyathus* Haller (Nidulariaceae, Agaricales, Basidiomycota). 2017. 244f. Tese (Doutorado em Sistemática e Evolução) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

DIXON, E. *et al*. Bacteria-induced static batch fungal fermentation of the diterpenoid cyathin A3, a small-molecule inducer of nerve growth factor. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 38(5): 607–615, 2011. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0805-7.

Dore-Guerra C.M.P. *et al*. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. Intemational Immunophannacology. 7: 1160–1169, 2007

GÓIS, J.S. *et al*. Taxonomic review and updates of the genus *Cyathus* (Agaricales, Basidiomycota) from Brazil. The Journal of the Torrey Botanical Society 148(3): 155–196, 2021. https://doi.org/10.3159/TORREY-D-21-00013.1.

HE, M.Q. *et al*. Species diversity of Basidiomycota. Fungal Diversity 114(1): 281–325, 2022. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00497-3.

HE, M.Q. *et al*. Phylogenomics, divergence times and notes of orders in Basidiomycota. Fungal Diversity 126: 127–406, 2024. https://doi.org/10.1007/s13225-024-00535-w.

HYDE, K.D. *et al*. The 2024 outline of fungi and fungus-like taxa. Mycosphere 15(1): 5146–6239, 2024. https://doi.org/10.5943/mycosphere/15/1/25.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). Plano de manejo da Floresta Nacional de Nísia Floresta: volume I – diagnóstico. Brasília, DF: ICMBio, 2012.

KANG, H.S. *et al*. Cyathusals A, B, and C, antioxidants from the fermented mushroom *Cyathus stercoreus*. Journal of Natural Products 70(6): 1043–1045, 2007. https://doi.org/10.1021/np060637h.

KASSAS, M. Environmental education: biodiversity. The Environmentalist 22(4): 345–351, 2002. https://doi.org/10.1023/A:1020766914456.

KIRK, P.M. *et al*. Dictionary of the Fungi. 10. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2008.

KORNERUP, A.; WANSCHER, J.H. Methuen Handbook of Colour. 3. ed. London: Eyre Methuen, 252 p., 1978.

LIMA, A.A. Fungos Gasteroides (Basidiomycota) na Área de Proteção Ambiental Piquiri-Una e no Parque Estadual Mata da Pipa, Rio Grande do Norte, Brasil. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2018.

MEDEIROS JÚNIOR, F.A.A.; GÓIS, J.S.; BASEIA, I.G. New records of *Cyathus* (Nidulariaceae, Basidiomycota) from conservation units in Northeastern Brazil. Lilloa 62(2): 673–695, 2025. https://doi.org/10.30550/j.lil/2118.

MILLER JÚNIOR, O.K.; MILLER, H.H. Gasteromycetes: Morphology and Developmental Features. Mad River, Eureka, CA, p. 3–156, 1988.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403(6772): 853–858, 2000. https://doi.org/10.1038/35002501.

OLIVEIRA, R.L. *et al*. Expanding the Phallales (Phallomycetidae, Basidiomycota) mycobiota of northeastern Brazil. The Journal of the Torrey Botanical Society 150(3): 398–408, 2023. https://doi.org/10.3159/TORREY-D-22-00028.1.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Biologia vegetal. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SILVA, B.D.B.; BASEIA, I.G.; CRUZ, R.H.S.F. Metodologia. In: BASEIA, I.G.; SILVA, B.D.B.; CRUZ, R.H.S.F. (org.). Fungos gasteroides no semiárido do Nordeste brasileiro. 1. ed. Feira de Santana: Print Mídia, 2014. p. 25–27.

SOUSA, J.O.; SILVA, B.D.B.; ALFREDO, D.S.; BASEIA, I.G. New records of Geastraceae (Basidiomycota, Phallomycetidae) from Atlantic Rainforest remnants and relicts of Northeastern Brazil. Darwiniana, nueva serie 2(2): 207–221, 2014.

SUNHEDE, S. Geastraceae (Basidiomycotina): morphology, ecology and systematics with special emphasis on the North European species. Synopsis Fungorum 1: 534 p., 1989.

SUNHEDE, S. Studies in Gasteromycetes. I. Notes on Spore Liberation and Spore Dispersal in *Geastrum*. Svensk Botanisk Tidskrift 68: 329–343, 1974.

TUNO, N. Spore dispersal of Dictyophora fungi (Phallaceae) by flies. Ecological Research 13: 7–15, 1998.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. Introduction to Fungi. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

Anexos



Imagem 1 - Fotografia em campo de basidioma expandido com peridíolos de Cyathus aff. earlei (A); Fotografia e endoperídio e exoperidio (B); Peridíolos (C); Basidioma desidratado (D); Córtex duplo (E); Microscopia de esporos (F)



Imagem 2 - Fotografia em campo de basidioma expandido com peridíolos de Cyathus triplex (A);Peridíolos (B); Basidioma desidratado (C); Exoperídio e endoperídio (D); Córtex duplo (E); Microscopias de esporos (F).



Imagem 3 - Fotografia em campo de basidioma expandido de Phallus purpurascens (A); Basdiomas desidratados (B); Basidioma imaturo no processo de expansão (C); Cristal visível em hifas da volva (D); Hifas do pseudoestipe (E); Microscopia de esporos



Imagem 4 - Fotografia em campo de basidioma expandido de Clathrus natalensis (A); Basdioma expandido desidratados (B); Tubos dos braços (C); Hifas pseudoparenquimatosas dos braços do receptáculo (D); Microscopia de esporos (E)



Imagem 5 - Fotografia de basidioma expandido desidratado de Geastrum neoamericanum (A); Peristômio fimbriado (B); Columela clavada inconspícua;Microscopia de esporo e capilício (D); Hifas da camada pseudoparenquimatosa (E); Hifas da camada micelial (F)



Imagem 6 - Fotografia de basidioma expandido desidratado de Geastrum fimbriatum (A); Peristômio fibriloso (B); Hifas da camada pseudoparenquimatosa (C); Microscopia de esporo e capilício (D); Hifas da camada micelial (E)

CÓDIGO: SB1023

AUTOR: SAMARA FERNANDES DA SILVA SOUZA

ORIENTADOR: KARINNA VERISSIMO MEIRA TAVEIRA

TÍTULO: As 100 revisões sistemáticas e meta-análises mais citadas em Fonoaudiologia: uma análise bibliométrica

Resumo

O objetivo desta pesquisa bibliométrica é identificar e analisar as 100 revisões sistemáticas mais citadas na área da fonoaudiologia, com o intuito de orientar profissionais interessados no tema e mapear as tendências atuais da área. Serão utilizados os bancos de dados Web of Science e Scopus, sem restrições de ano de publicação ou idioma. Serão conduzidas análises descritivas e mapeamento científico dos seguintes parâmetros: número de citações, ano de publicação, índice de citações locais do periódico, autores, número de autores, metodologia do desenho (revisão sistemática ou revisão sistemática com meta-análise), área de estudo de cada manuscrito, instituição e país. O país de origem e a instituição contribuinte do artigo serão definidos pelo endereço fornecido para o autor correspondente. O resultado deste estudo pode servir como fonte de informação para orientar não apenas pesquisadores, mas também fonoaudiólogos e estudantes sobre as áreas em tendência, impactando diversas subáreas da fonoaudiologia. No entanto, este estudo não refletirá a qualidade das revisões sistemáticas incluídas.

Palavras-chave: Terapia da Fala, Terapias da Fala, Ciências da Fala, Linguagem.

TITLE: The 100 Most Cited Systematic Reviews and Meta-Analyses in Speech-Language Pathology: A Bibliometric Analysis

Abstract

The objective of this bibliometric study is to identify and analyze the 100 most cited systematic reviews in the field of speech-language pathology, with the aim of guiding professionals interested in the topic and mapping current trends in the field. The Web of Science and Scopus databases will be used, with no restrictions on publication year or language. Descriptive analyses and scientific mapping will be conducted based on the following parameters: number of citations, publication year, journal local citation index, authors, number of authors, study design methodology (systematic review or systematic

review with meta-analysis), study area of each manuscript, institution, and country. The country of origin and contributing institution of each article will be determined based on the address provided for the corresponding author. The results of this study may serve as a source of information to guide not only researchers, but also speech-language pathologists and students regarding emerging areas and trends, with potential implications across various subfields of speech-language pathology. However, this study will not reflect the quality of the included systematic reviews.

Keywords: Speech Therapy, Speech Therapies, Speech, Language and Hearing Science

Introdução

A tomada de decisões clínicas, incluindo a escolha de tratamentos, é atualmente baseada na medicina baseada em evidências, tanto em nível nacional quanto internacional, em todos os campos da medicina, incluindo a fonoaudiologia (Sackett et al., 1996; Miranda et al., 2019). Ensaios clínicos randomizados (ECRs) são considerados o padrão-ouro de estudo para responder a questões clínicas específicas, servindo como guia essencial para a tomada de decisões baseadas em evidências. No entanto, a maioria dos ECRs exige um grande tamanho amostral para alcançar resultados estatisticamente confiáveis, o que representa um desafio significativo para os pesquisadores. Revisões sistemáticas com meta-análises permitem combinar dados de ECRs individuais, proporcionando conclusões mais robustas e confiáveis sobre questões clínicas. Além disso, existem ferramentas para avaliar a qualidade dos ECRs, possibilitando recomendações específicas sobre questões clínicas. Atualmente, revisões sistemáticas e meta-análises são consideradas os delineamentos de estudo de mais alta qualidade (CEBM, [s. d.]).

No entanto, muitos profissionais de saúde frequentemente não conseguem ou não desejam acessar ou ler evidências primárias (McColl et al., 1998). Há também indicações de que as revisões sistemáticas da Cochrane não são tão citadas e populares quanto aquelas publicadas em revistas de alto impacto. Esse achado é surpreendente, pois as revisões sistemáticas da Cochrane são geralmente consideradas o padrão de referência; uma explicação possível é o formato de apresentação, que pode ser difícil de ler e frequentemente considerado monótono (Porfirio et al., 2018). Portanto, resumos de evidências, como revisões sistemáticas e diretrizes clínicas, podem ser uma maneira eficaz de implementar a fonoaudiologia baseada em evidências na prática clínica.

Outro tipo de pesquisa, utilizado para mostrar o impacto das publicações é chamado de bibliometria. A primeira referência sobre bibliometria foi feita por Pritchard em 1969 (Pritchard, 1969). Existem algumas publicações sobre análise bibliométrica no campo da Fonoaudiologia, mas especificadas em disfagia (Sun et al., 2022) e autismo (Díaz et al., 2022). A análise de citações é um tipo de bibliometria que quantifica quantas vezes uma publicação foi citada após sua publicação. Essas informações podem ser eficientes para avaliar o impacto de uma publicação em um campo específico e, portanto, a importância dessa publicação nesse campo. Assim, quanto mais citada for a publicação, maior será o seu impacto (Agarwal et al., 2016). No entanto, há evidências que indicam

que erros nos "fatos" citados podem ser perpetuados com citações repetidas, influenciando negativamente a prática e a política (Sa, 2017).

Além disso, para fonoaudiólogos e clínicos que já utilizam a fonoaudiologia baseada em evidências em sua prática clínica, essa análise pode ser uma ferramenta importante para guiar os clínicos na identificação das publicações com maior impacto em seu campo de atuação, ajudando-os na tomada de decisões.

Após o ano 2000, houve um enorme aumento no número de revisões sistemáticas publicadas em fonoaudiologia. Até onde sabemos, não há estudos que investiguem as revisões sistemáticas e/ou meta-análise mais citadas na área da fonoaudiologia. Assim, após 14 anos de pesquisa mundial, é imperativo compreender como a pesquisa na área da fonoaudiologia tem evoluído e sido transformada, investigando a bibliometria das revisões sistemáticas. O objetivo desta pesquisa bibliométrica é, portanto, identificar e analisar as 100 revisões sistemáticas e/ou meta-análises mais citadas na área da fonoaudiologia, a fim de orientar profissionais de qualquer nível com interesse no tema e mapear as tendências atuais na área.

Metodologia

Fontes de informação e estratégia de busca

Fontes de informação e estratégia de busca

Foram realizadas buscas eletrônicas nas bases de dados Web of Science Core Collection (WoS-CC) e Scopus. A estratégia de busca utilizou termos relacionados à Fonoaudiologia, incluindo Speech Therapy, Speech Therapies, Speech, Language and Hearing Sciences, Speech-Language Pathology, Speech Language Pathology, Language Pathology e Speech Pathology, combinados aos termos Meta-Analysis, Meta Analysis, MetaAnalysis e Systematic Review. Os resultados foram organizados em ordem decrescente de acordo com o número de citações.

Critérios de elegibilidade

Foram considerados elegíveis estudos diretamente relacionados à área da Fonoaudiologia, especificamente revisões sistemáticas e/ou meta-análises, sem restrições quanto ao idioma ou à data de publicação.

Foram excluídos estudos cujo desfecho principal não estivesse relacionado a aspectos da Fonoaudiologia, assim como estudos primários.

Processo de seleção

O processo de seleção foi realizado por dois revisores independentes e ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa, foram avaliados os títulos e resumos das referências recuperadas pela estratégia de busca, organizadas em ordem decrescente de número de

citações para cada base de dados. Os estudos que não atenderam aos critérios de elegibilidade foram excluídos.

Na segunda etapa, foi realizada a leitura integral das referências selecionadas na primeira etapa, aplicando-se os mesmos critérios de elegibilidade.

As etapas de leitura foram realizadas na plataforma Rayyan, com cegamento dos revisores. Nos casos de discordância que não foram solucionados por discussão, um terceiro revisor foi envolvido para decisão.

Coleta de dados e análise bibliométrica

Foram extraídos e organizados os seguintes dados dos artigos: número de citações, média de citações por ano, ano de publicação, índice de citações locais do periódico, autores e país. O país de origem e a instituição contribuinte foram definidos a partir do endereço fornecido para o autor correspondente. Para a síntese das informações extraídas, utilizou-se a ferramenta de inteligência artificial NotebookLM (Google), com posterior verificação das informações por uma das revisoras, a fim de garantir a fidelidade dos dados.

Os artigos foram classificados em ordem decrescente de acordo com a contagem de citações na Web of Science, sendo definidos os 100 artigos mais citados. Posteriormente, os dados de citações desses artigos foram comparados com aqueles registrados na Scopus. Também foi considerada a densidade de citações, calculada a partir da média de citações por ano de publicação, utilizando a contagem de citações da Web of Science.

Resultados e Discussões

Resultados

A busca nas bases de dados Web of Science e Scopus identificou inicialmente 1.278 registros, sendo 330 provenientes da Web of Science e 948 da Scopus. Após a remoção de 222 registros duplicados, permaneceram 1.056 referências para avaliação. Na primeira etapa de seleção, foram incluídos 251 estudos para leitura na íntegra. Após a aplicação dos critérios de elegibilidade na segunda etapa, 232 estudos permaneceram incluídos.

Os 100 artigos analisados foram publicados de 1998 a 2024, evidenciando uma ampla distribuição ao longo do tempo. A maior concentração de artigos aconteceu na década de 2010, com um total de 51, e logo depois, na década de 2020, foram publicados 40 artigos. Foram oito publicações na década de 2000 e uma na década de 1990. Quando olhamos para cada ano separadamente, 2021 foi o ano com mais publicações, totalizando 14 artigos, enquanto 2022 ficou com 12. Nos anos de 2017 e 2018, foram publicados 10 artigos em cada um desses anos.

Em relação às citações, os 100 registros totalizaram 16.214 citações considerando a soma dos valores apresentados para Web of Science e Scopus, correspondendo a uma média de 162,14 citações por artigo. O número total de citações por publicação variou de 34 a 813. Entre os 100 registros, 55 apresentaram mais de 100 citações, enquanto 45 apresentaram até 100 citações.

O artigo com maior número total de citações entre os 100 registros foi "A meta-analysis of clinical outcomes in the treatment of aphasia", publicado em 1998, com 362 citações na Web of Science e 451 na Scopus, totalizando 813 citações. Na sequência, destacaram-se "The Efficacy of Treatment for Children With Developmental Speech and Language Delay/Disorder: A Meta-Analysis", de 2004, com 645 citações; "Screening for Speech and Language Delay in Preschool Children: Systematic Evidence Review for the US Preventive Services Task Force", de 2006, com 610; "Acoustic measurement of overall voice quality: A meta-analysis", de 2009, com 608; e "The Impact of Augmentative and Alternative Communication Intervention on the Speech Production of Individuals With Developmental Disabilities: A Research Review", de 2006, com 579 citações.

A comparação entre as bases de dados demonstrou diferenças no número de citações atribuídas aos artigos. Em alguns casos, a Scopus apresentou valores superiores aos da Web of Science, como observado em "A meta-analysis of clinical outcomes in the treatment of aphasia" (451 e 362), "The Efficacy of Treatment for Children With Developmental Speech and Language Delay/Disorder: A Meta-Analysis" (354 e 291) e "Acoustic measurement of overall voice quality: A meta-analysis" (343 e 265). Em outros estudos, a Web of Science apresentou maior número de citações, como em "Parent-mediated early intervention for young children with autism spectrum disorders", que apresentou 343 citações na Web of Science e 163 na Scopus.

Quanto às temáticas, os 100 registros contemplaram diferentes sub áreas da Fonoaudiologia. Observou-se presença expressiva de estudos relacionados à linguagem e afasia, incluindo intervenções após acidente vascular cerebral, terapia de busca lexical, análise de características semânticas, telereabilitação e estimulação cerebral não invasiva. Também foram identificados estudos relacionados à voz, abrangendo avaliação acústica, terapia vocal, laringectomia, disfonia e tempo máximo de fonação.

Também foram encontrados estudos voltados aos transtornos do desenvolvimento da fala e da linguagem, incluindo transtorno do desenvolvimento da linguagem, transtornos dos sons da fala, apraxia de fala na infância e intervenções destinadas ao público infantil. Entre os registros, destacam-se estudos sobre intervenção para crianças com atraso ou transtorno primário de fala e linguagem, apraxia da fala, intervenção baseada em narrativas e intervenções para transtornos dos sons da fala.

A disfagia também esteve representada entre os estudos, incluindo investigações sobre disfagia orofaríngea, pacientes com câncer de cabeça e pescoço, reabilitação pós-AVC e intervenção fonoaudiológica. Além disso, foram identificados estudos envolvendo fissura palatina, gagueira, transtorno do espectro autista, comunicação suplementar e alternativa, perda auditiva, doenças neurodegenerativas e telessaúde.

Entre os recursos e modalidades de intervenção identificados nos títulos dos artigos, destacaram-se abordagens tecnológicas e remotas, como telessaúde, telereabilitação e

sistemas virtuais de terapia da fala, além de estratégias de estimulação cerebral, biofeedback e recursos voltados à comunicação suplementar e alternativa.

De maneira geral, os 100 primeiros registros analisados apresentaram ampla diversidade temática, abrangendo diferentes populações, condições clínicas e modalidades de intervenção fonoaudiológica. Os dados de citação evidenciaram ainda que publicações de diferentes períodos alcançaram elevado impacto, incluindo estudos publicados no final da década de 1990 e início dos anos 2000, bem como trabalhos mais recentes, publicados entre 2021 e 2024. Dessa forma, o conjunto analisado permitiu identificar um panorama diversificado das revisões sistemáticas e meta-análises que compõem os registros de maior destaque bibliométrico considerados nesta etapa da pesquisa.

Discussão

As revisões sistemáticas e meta-análises na Fonoaudiologia apresentam uma diversidade de temas, como demonstrado na análise dos 100 artigos mais citados. Entre esses trabalhos, tiveram destaque aqueles que abordam a linguagem e a afasia, bem como aqueles que se relacionam à voz, à disfagia, aos transtornos dos sons da fala, aos transtornos do desenvolvimento da linguagem, à comunicação suplementar e alternativa, ao autismo e à fissura palatina. Isso mostra a diversidade dos tópicos abordados nas publicações que tiveram maior impacto bibliométrico.

A presença de artigos publicados desde 1998 até 2024 indica que publicações de diferentes períodos alcançaram elevada repercussão. O artigo mais citado do conjunto foi “A meta-analysis of clinical outcomes in the treatment of aphasia”, que foi publicado em 1998, enquanto trabalhos mais recentes também estiveram entre os 100 primeiros. Essa distribuição reforça a importância de considerar o tempo de publicação na interpretação das citações, aspecto previsto no projeto por meio da análise da densidade de citações.

Embora o número de citações permita identificar publicações de maior impacto bibliométrico, esse indicador não deve ser interpretado isoladamente como medida de qualidade metodológica ou relevância clínica. O próprio projeto ressalta que a análise de citações pode auxiliar na identificação de estudos de impacto, mas também reconhece que informações podem ser perpetuadas por meio de citações repetidas. Assim, os 100 artigos identificados representam um panorama das publicações de maior repercussão bibliométrica, e não necessariamente das melhores evidências disponíveis para a prática fonoaudiológica.

Dessa forma, os resultados contribuem para mapear parte da produção científica de maior impacto em Fonoaudiologia e podem auxiliar na identificação de referências relevantes para profissionais e pesquisadores. A análise também constitui uma base para o aprofundamento de outras características dos artigos, como autores, periódicos, países, instituições e demais indicadores bibliométricos previstos no projeto.

Conclusão

A presente pesquisa permitiu identificar e analisar as revisões sistemáticas e meta-análises de maior impacto bibliométrico na área da Fonoaudiologia, contribuindo para o mapeamento das publicações que apresentaram maior número de citações. Os 100 artigos analisados revelaram uma variedade na produção científica, abrangendo várias áreas de atuação da Fonoaudiologia e artigos de diferentes períodos. Além disso, a comparação dos dados de citações entre a Web of Science e a Scopus revelou algumas discrepâncias nos indicadores entre essas duas bases. Assim, o trabalho ajudou a mapear e a qualificar uma parte da produção científica mais influente na área, podendo servir de auxílio a pesquisadores, alunos e profissionais na identificação de publicações importantes. Entretanto, é importante enfatizar que o número de citações é um indicador de impacto bibliométrico e não deve ser usado de forma isolada para avaliar a qualidade metodológica ou a relevância clínica das revisões analisadas.

Referências

SACKETT, D. L. R. W.; GRAY, J. M.; HAYNES, R. B.; RICHARDSON, W. S. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. BMJ, v. 312, p. 71-72, 1996. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.312.7023.71.

MIRANDA, V. S. G. de M. M.; RECH, R. S.; BARBOSA, L. R.; FISCHER, G. B. Evidence-based speech therapy: the role of systematic revisions. CoDAS, v. 31, n. 2, e20180167, 2019. DOI: 10.1590/2317-1782/20182018167.

CENTRE FOR EVIDENCE-BASED MEDICINE (CEBM). CEBM develops, promotes and disseminates better evidence for healthcare. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: https://www.cebm.net/category/open-evidence-reviews/. Acesso em: 10/08/2026

MCCOLL, A. S. H.; WHITE, P.; FIELD, J. General practitioner's perceptions of the route to evidence based medicine: a questionnaire survey. BMJ, v. 316, n. 7128, p. 361-365, 1998. DOI: 10.1136/bmj.316.7128.361.

PORFIRIO, G. P. R.; PARRA, M. T.; LATORRACA, C. D. O. C.; MARTIMBIANCO, A. L. C.; PACHITO, D. V.; RIERA, R. Why do Cochrane Reviews have fewer citations than systematic reviews from journals with high impact factors? Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 9, supl. 1, 2018. DOI: 10.1002/14651858.CD201801.

PRITCHARD, A. Statistical bibliography or bibliometrics. Journal of Documentation, v. 25, n. 4, p. 348-349, 1969.

SUN, W. K. X.; ZHAO, N.; DONG, X.; LI, S.; ZHANG, G.; LIU, G.; YANG, Y.; ZHENG, C.; YU, G.; SHUAI, L.; FENG, Z. Study on dysphagia from 2012 to 2021: a bibliometric analysis via CiteSpace. Frontiers in Neurology, v. 13, 1015546, 2022. DOI: 10.3389/fneur.2022.1015546.

DÍAZ, M. T. M.; GIL, R. M.; CABEZA, L. F.; ARAS, L. M. A. Comparative analysis of Scopus and Web of Science (WoS) literature on the autism crisis. Review Journal of

Autism and Developmental Disorders, v. 9, p. 618-634, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/s40489-021-00277-4.

AGARWAL, A.; TATAGARI, S.; ESTEVES, S. C.; HARLEV, A.; HENKEL, R.; ROYCHOUDHURY, S.; HOMA, S. et al. Bibliometrics: tracking research impact by selecting the appropriate metrics. Asian Journal of Andrology, v. 18, p. 296-309, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.171582.

SA, M. Accuracy of cited "facts" in medical research articles: a review of study methodology and recalculation of quotation error rate. PLoS ONE, v. 12, n. 9, e0184727, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184727.

ARIA, M.; CUCCURULLO, C. Bibliometrix: an R-tool for comprehensive science mapping analysis. Journal of Informetrics, v. 11, n. 4, p. 959-975, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.joi.2017.08.007.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. [S. l.]: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: http://www.r-project.org/.

ABDOU, A. M. E. M.; NAGENDRABABU, V.; NAZZAL, H.; DUGGAL, M. Tooth auto-transplantation: a bibliometric analysis of the top 100 most-cited articles. Dental Traumatology, v. 39, n. 1, p. 64-81, 2023. DOI: https://doi.org/10.1111/edt.12779.

AGARWAL, A. et al. Bibliometrics: tracking research impact by selecting the appropriate metrics. Asian Journal of Andrology, v. 18, p. 296-309, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.171582.

DÍAZ, M. T. M. et al. Comparative analysis of Scopus and Web of Science (WoS) literature on the autism crisis. Review Journal of Autism and Developmental Disorders, v. 9, p. 618-634, 2022. DOI: 10.1007/s40489-021-00277-4.

MIRANDA, V. S. G. et al. Evidence-based speech therapy: the role of systematic revisions. CoDAS, v. 31, n. 2, e20180167, 2019. DOI: 10.1590/2317-1782/20182018167.

PORFIRIO, G. P. et al. Why do Cochrane Reviews have fewer citations than systematic reviews from journals with high impact factors? Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 9, supl. 1, 2018. DOI: 10.1002/14651858.CD201801.

PRITCHARD, A. Statistical bibliography or bibliometrics. Journal of Documentation, v. 25, n. 4, p. 348-349, 1969.

SA, M. Accuracy of cited “facts” in medical research articles: a review of study methodology and recalculation of quotation error rate. PLoS ONE, v. 12, n. 9, e0184727, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184727.

SUN, W. K. X. et al. Study on dysphagia from 2012 to 2021: a bibliometric analysis via CiteSpace. Frontiers in Neurology, v. 13, 1015546, 2022. DOI: 10.3389/fneur.2022.1015546.

Google (2026) NotebookLM: note taking and research assistant powered by AI. Available at: https://notebooklm.google/. Acesso em 10/08/2026

CÓDIGO: SB1031

AUTOR: JOSÉ EDUARDO GOMES DE OLIVEIRA

COAUTOR: LEANDRO ALVES DA SILVA

ORIENTADOR: ADRIAN ANTONIO GARDA

TÍTULO: Filogeografia mitocondrial do lagarto Hemidactylus brasilianus no nordeste brasileiro

Resumo

Hemidactylus brasilianus é uma lagartixa amplamente distribuída no Nordeste brasileiro, mas sua diversidade genética e história evolutiva ainda são pouco conhecidas. Este estudo investigou a estrutura filogeográfica da espécie e a possível influência do rio São Francisco sobre sua diferenciação. Foram analisadas sequências do gene mitocondrial 12S de 45 indivíduos provenientes de 15 localidades, utilizando inferências bayesiana e de máxima verossimilhança, rede de haplótipos, distâncias genéticas, AMOVA, teste de Mantel, regressão sobre matrizes de distância e testes demográficos. Foram identificados 32 haplótipos e quatro linhagens mitocondriais principais, com distâncias médias entre 6,3% e 9,6%. A divergência mais antiga no complexo foi estimada em aproximadamente 7,48 milhões de anos. A estrutura genética foi elevada, e a separação entre as margens do São Francisco explicou parte significativa da variação. Entretanto, a ocorrência da linhagem A e o compartilhamento de haplótipos nas duas margens indicam que o rio atua como barreira parcial, e não absoluta. Os resultados sustentam a hipótese de que *H. brasilianus* possa representar um complexo de linhagens profundamente diferenciadas, que deverá ser avaliado com maior amostragem, marcadores adicionais, evidências morfológicas e ambientais.

Palavras-chave: Filogeografia; Estrutura genética; Rio São Francisco; Caatinga.

TITLE: MITOCHONDRIAL PHYLOGEOGRAPHY OF THE LIZARD HEMIDACTYLUS BRASILIANUS IN NORTHEASTERN BRAZIL

Abstract

Hemidactylus brasilianus is a gecko widely distributed across northeastern Brazil, but its genetic diversity and evolutionary history remain poorly understood. This study investigated the species phylogeographic structure and the possible influence of the São Francisco River on its differentiation. Mitochondrial 12S sequences from 45 individuals collected at 15 localities were analyzed using Bayesian inference and maximum likelihood, a haplotype network, genetic distances, AMOVA, a Mantel test, multiple

regression on distance matrices, and demographic tests. Thirty-two haplotypes and four main mitochondrial lineages were identified, with mean genetic distances ranging from 6.3% to 9.6%. The oldest divergence within the complex was estimated at approximately 7.48 million years ago. Genetic structure was high, and separation between the São Francisco River explained a significant portion of the variation. However, the occurrence of lineage A and shared haplotypes on both banks indicate that the river acts as a partial rather than absolute barrier. The results support the hypothesis that *H. brasilianus* may represent a complex of deeply differentiated lineages, which should be evaluated using broader sampling, additional markers, and morphological and environmental evidence.

Keywords: Phylogeography; Genetic structure; São Francisco River; Caatinga.

Introdução

A Filogeografia investiga os processos históricos responsáveis pela distribuição espacial das linhagens genéticas, integrando dados moleculares e geográficos para compreender como mudanças climáticas e características da paisagem influenciam a diversificação das espécies (Avise, 2000). Na região Neotropical, essa abordagem tem revelado histórias evolutivas complexas e linhagens geneticamente distintas em áreas antes consideradas homogêneas.

A Caatinga ocupa grande parte do semiárido brasileiro e integra a Diagonal de Formações Abertas da América do Sul. Reconhecida por sua riqueza, endemismo e heterogeneidade ambiental, apresenta depressões, planaltos, serras e afloramentos rochosos distribuídos ao longo de gradientes de altitude, temperatura, precipitação e aridez. Essa diversidade de paisagens pode modificar a conectividade entre populações e favorecer sua diferenciação genética (Werneck et al., 2012; Fernandes et al., 2022). Sua biota também foi influenciada pela formação da paisagem e pelas oscilações climáticas do Quaternário, que alteraram a distribuição das formações abertas e florestais e podem ter produzido episódios de conexão e isolamento populacional (Gehara et al., 2017; Guillory et al., 2024).

Além das mudanças climáticas, feições da paisagem podem restringir o fluxo gênico. O rio São Francisco é uma das principais feições hidrográficas da Caatinga e tem sido proposto como barreira biogeográfica. Sua influência, contudo, varia entre os organismos: em algumas espécies, coincide com a separação de linhagens; em outras, representa uma barreira parcial ou recente (Lanna et al., 2020). A diferenciação genética também pode aumentar com a distância geográfica, dificultando distinguir o efeito do rio daquele produzido pelo afastamento espacial. Gradientes ambientais constituem uma hipótese complementar para estudos posteriores.

Lagartos com baixa capacidade de dispersão e associação a determinados substratos são modelos relevantes para estudos filogeográficos. O gênero Hemidactylus apresenta ampla distribuição e uma história marcada por dispersões entre continentes. Evidências filogenéticas sugerem que a linhagem sul-americana que inclui Hemidactylus brasilianus possui afinidades com linhagens africanas, possivelmente resultantes de um antigo evento de dispersão transatlântica ocorrido por volta de 15 Ma atrás, durante o Mioceno (Carranza & Arnold, 2006; Gamble et al., 2011).

Hemidactylus brasilianus é uma lagartixa neotropical distribuída principalmente no Nordeste brasileiro e no norte de Minas Gerais, sobretudo em áreas da Caatinga. Apesar dessa ampla distribuição, sua diversidade genética e história evolutiva permanecem pouco conhecidas. Os dados moleculares anteriormente disponíveis provinham de poucos indivíduos de uma única localidade do Piauí (Carranza & Arnold, 2006), impedindo avaliar a variação ao longo de sua distribuição. Uma amostragem mais abrangente pode revelar estrutura geográfica profunda e diversidade evolutiva ainda não reconhecida.

Neste estudo, foram analisadas sequências do gene mitocondrial 12S de 45 indivíduos provenientes de 15 localidades. Buscou-se caracterizar a diversidade genética e haplotípica, reconstruir as relações filogenéticas, avaliar a distribuição geográfica das linhagens, testar o isolamento por distância e a associação da diferenciação genética com as margens do rio São Francisco e investigar sinais de mudanças demográficas. Embora o DNA mitocondrial seja informativo para detectar estrutura filogeográfica, representa a história de um único locus e não permite, isoladamente, delimitar espécies. Assim, os agrupamentos recuperados são tratados como linhagens evolutivas candidatas, a serem avaliadas futuramente com marcadores adicionais, dados morfológicos e análises ambientais. Os resultados ampliam o conhecimento sobre a história evolutiva de H. brasilianus e fornecem subsídios para investigações taxonômicas e biogeográficas.

Metodologia

Área de estudo e delineamento geográfico

Foram analisados 45 indivíduos de Hemidactylus brasilianus provenientes de 15 localidades da Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e norte de Minas Gerais, incluindo pontos ao norte e ao sul do rio São Francisco (Tabela 1). Os tecidos, principalmente de fígado, foram obtidos de coleções de tecidos associados à Universidade Federal do Rio Grande do Norte e à Universidade Federal da Paraíba. As localidades foram georreferenciadas com as coordenadas dos espécimes, e o mapa foi produzido no R com bases cartográficas do IBGE.

Extração, amplificação e sequenciamento

O DNA genômico foi extraído pelo protocolo salino de Aljanabi e Martinez (1997). Sua presença, integridade e concentração aproximada foram avaliadas em gel de agarose a 1%. O fragmento mitocondrial 12S foi amplificado por PCR com os primers da Tabela 2, verificado por eletroforese e sequenciado pelo método de Sanger no Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás. As sequências foram inspecionadas no BioEdit a partir dos cromatogramas, tiveram extremidades de baixa qualidade removidas e foram alinhadas pelo MUSCLE (Edgar, 2004), seguido de inspeção visual. O alinhamento do grupo interno apresentou 442 posições; nas reconstruções com dois grupos externos, utilizou-se a região compartilhada de 380 posições.

Caracterização e saturação

Para o conjunto sem grupos externos foram registrados comprimento, bases ambíguas e sítios constantes, variáveis e parcimoniosamente informativos. Número de haplótipos, diversidades haplotípica e nucleotídica e diferenças nucleotídicas médias foram estimados no DnaSP v.6.12.03 (Rozas et al., 2017). A saturação foi avaliada no DAMBE pelo índice de Xia, comparando-se Iss com valores críticos para topologias simétrica e assimétrica; Iss significativamente menor que Iss.c foi considerado indicativo de pouca saturação. Os dados foram registrados na Tabela 3.

Inferências filogenéticas e temporais

O jModelTest v.2.1.10 selecionou pelo BIC o modelo HKY+G para o 12S, tratado como uma partição. Relações e tempos de divergência foram estimados no BEAST v.2.7.7 (Bouckaert et al., 2019), incluindo Hemidactylus bouvieri e H. greeffi como grupos externos. Utilizou-se HKY+G, relógio estrito com taxa fixa de 0,00755 substituições por sítio por milhão de anos e prior de especiação Yule. Foram realizadas duas corridas independentes de 30 milhões de gerações, com parâmetros e árvores amostrados a cada 3.000 gerações. A convergência foi avaliada no Tracer v.1.7.2, adotando-se ESS > 200. Removeram-se uma única vez os primeiros 10% de cada corrida, e os arquivos foram unidos no LogCombiner. A árvore de máxima credibilidade foi sumarizada no TreeAnnotator com burn-in adicional zero e visualizada no FigTree v.1.4.4 e os nós foram representados por probabilidades posteriores, idades e intervalos HPD de 95%.

Uma árvore de máxima verossimilhança foi inferida no IQ-TREE v.3.1.3, com seleção pelo ModelFinder. O BIC indicou HKY+F+G4, e os suportes foram estimados com 1.000 réplicas de SH-aLRT e 1.000 de ultrafast bootstrap, utilizando os mesmos grupos externos.

Haplótipos e distâncias

As relações haplotípicas foram representadas por rede de abrangência mínima (MSN) no PopART v.1.7 (Leigh & Bryant, 2015), sem grupos externos e colorida pelas linhagens filogenéticas. As distâncias genéticas entre linhagens foram calculadas no MEGA com exclusão completa de sítios contendo lacunas ou ambiguidades.

Estrutura espacial e rio São Francisco

A variação molecular foi avaliada por AMOVA hierárquica baseada em diferenças pareadas no Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), considerando variação entre margens, entre localidades dentro das margens e dentro das localidades. A significância dos componentes e índices Φ foi testada com 10.000 permutações. Calcularam-se distâncias geográficas sobre a superfície terrestre e distâncias genéticas médias entre localidades. O Mantel de Spearman, com 9.999 permutações, testou isolamento por distância. Regressões múltiplas sobre matrizes no pacote ecodist, também com 9.999 permutações, avaliaram modelos com distância geográfica, variável binária para mesma margem ou margens opostas e ambas. No R, a exclusão completa foi a abordagem principal e a exclusão pareada, a análise de sensibilidade.

História demográfica das linhagens

Tajima's D e Fu's Fs foram calculados no DnaSP para o total e para linhagens com amostragem e variação suficientes. A significância foi avaliada por simulações coalescentes, adotando-se $p < 0,05$ como valor estatisticamente significativo. Valores negativos e significativos foram considerados compatíveis com excesso de variantes raras, mas não isoladamente como evidência de expansão, devido aos efeitos possíveis da estrutura populacional e do tamanho amostral.

Resultados e Discussões

Amostragem e caracterização do conjunto de dados

Foram catalogadas 49 amostras atribuídas a Hemidactylus brasilianus, das quais 45 produziram sequências utilizáveis do gene mitocondrial 12S. A amostragem abrangeu 15 localidades distribuídas nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte, além do norte de Minas Gerais (Tabela 1; Figura 1). Essa distribuição inclui localidades situadas em diferentes porções da Caatinga e áreas adjacentes, contemplando regiões ao norte e ao sul do rio São Francisco e ambientes associados a formações serranas, como a Serra das Confusões, a Chapada Diamantina e a região de Monte Azul.

A cobertura geográfica obtida representa um avanço em relação ao conhecimento molecular anterior da espécie, que estava concentrado em poucos indivíduos e localidades. Entretanto, a distribuição das amostras foi desigual: enquanto a linhagem A reuniu 30 indivíduos provenientes de dez localidades, as linhagens B, C e D foram representadas, respectivamente, por cinco, oito e dois indivíduos. Assim, as inferências referentes à linhagem A possuem maior cobertura geográfica e amostral, enquanto as estimativas de diversidade e história demográfica das demais linhagens devem ser consideradas preliminares. A ausência de amostras em áreas intermediárias também limita a identificação de possíveis zonas de contato e transições entre as linhagens.

Informações do marcador e caracterização molecular

O alinhamento do 12S apresentou comprimento bruto de 442 pares de bases, dos quais 432 permaneceram disponíveis após a exclusão completa de posições com lacunas ou dados ausentes. Entre essas posições, 333 foram constantes e 99 variáveis, incluindo 67 sítios parcimoniosamente informativos. Foram identificados 32 haplótipos entre os 45 indivíduos, com diversidade haplotípica elevada ($Hd = 0,9768$), diversidade nucleotídica de $\pi = 0,04258$ e média de 18,44 diferenças nucleotídicas entre pares de sequências. A frequência de bases ambíguas foi de apenas 0,01%, indicando boa qualidade geral das sequências.

A elevada diversidade haplotípica demonstra que a amostragem recuperou considerável variação mitocondrial. A diversidade nucleotídica total, entretanto, deve ser interpretada em conjunto com a forte estrutura filogenética observada, pois o agrupamento de linhagens profundamente divergentes em uma única estimativa aumenta a média de diferenças entre sequências. Isso é corroborado pelas estimativas dentro das linhagens, que foram inferiores à estimativa total: $\pi = 0,01236$ na linhagem A, $\pi = 0,00826$ na

linhagem B e $\pi = 0{,}02159$ na linhagem C. Portanto, parte substancial da diversidade total decorre das diferenças entre as linhagens mitocondriais, e não apenas da variação existente dentro de cada população.

O teste de saturação revelou Iss = 0,097, significativamente inferior ao valor crítico calculado para uma topologia assimétrica, Iss.cAsym = 0,368 ($p < 0{,}0001$). Esse resultado permite rejeitar a ocorrência de saturação substancial no conjunto de dados e indica que o alinhamento conserva sinal histórico adequado para as inferências filogenéticas propostas, segundo o critério de (Xiao et al, 2003). A ausência de saturação, contudo, não elimina limitações relacionadas à utilização de um único locus mitocondrial.

Relações filogenéticas entre as linhagens

As reconstruções filogenéticas evidenciaram quatro linhagens mitocondriais principais, denominadas A, B, C e D (Figuras 2 e 3). Na inferência bayesiana, a linhagem A reuniu 30 indivíduos e apresentou probabilidade posterior igual ou próxima de 1,00. A linhagem B, constituído exclusivamente por cinco indivíduos de Monte Azul, também recebeu suporte posterior máximo. A linhagem C, formado por oito indivíduos de Mucugê e Palmeiras, apresentou probabilidade posterior de 0,97. A linhagem D reuniu os indivíduos de Itaberaba e Elísio Medrado, cujas sequências foram idênticas. Em contraste com o elevado suporte das divergências principais, alguns nós que definem suas relações mais profundas apresentaram probabilidades posteriores próximas de 0,77, indicando incerteza quanto à ordem exata das divergências.

A análise de máxima verossimilhança, realizada sob o modelo HKY+F+G4, recuperou o conjunto de H. brasilianus com suporte de 99,6% no SH-aLRT e 100% no ultrafast bootstrap. Os agrupamentos B e D apresentaram suportes de 39,8/50, enquanto o agrupamento C recebeu 69,2/39. Um agrupamento central da linhagem A foi recuperado com 97,2/96, mas a posição da amostra de Umburanas mostrou maior instabilidade. Apesar dos valores baixos de SH-aLRT e ultrafast bootstrap para alguns agrupamentos, a árvore foi considerada como análise preliminar para definição das linhagens candidatas.

Em conjunto, os métodos concordam na existência de linhagens mitocondriais geográfica e geneticamente diferenciadas, mas apresentam menor concordância quanto às relações entre elas e à posição de algumas amostras. Estudos multilocus realizados em outros gecos das formações abertas sul-americanas também recuperaram linhagens profundas e diversidade críptica, como em Phyllopezus (Gamble et al., 2012) e Lygodactylus (Lanna et al., 2018). Entretanto, as linhagens aqui reconhecidas devem ser denominadas como linhagens mitocondriais candidatas, e não espécies, até que sejam avaliadas por marcadores nucleares, dados morfológicos e métodos apropriados de delimitação.

Não é possível avaliar, nesta etapa, a concordância entre genes, pois todas as inferências foram produzidas com o 12S. Essa comparação deverá ser realizada posteriormente com CYTB, ND2, RAG1 e C-mos.

Estimativas dos tempos de divergência

A árvore temporal (Figura 4) estimou em 13,71 milhões de anos a idade da raiz que reúne H. brasilianus e os grupos externos, com intervalo de maior densidade posterior de 95% entre 10,13 e 17,17 Ma. Dentro do complexo de H. brasilianus, a divergência mais antiga

foi estimada em 7,48 Ma, com HPD95% de 5,38–9,60 Ma, correspondendo à separação da linhagem D em relação às demais. A divergência subsequente, associada à separação da linhagem C, foi estimada em 5,52 Ma, com HPD95% de 4,05–7,02 Ma. O nó que separa a linhagem B da linhagem A foi estimado em 4,47 Ma, com HPD95% de 3,24–5,79 Ma.

Essas estimativas situam a formação das principais linhagens entre o Mioceno tardio e o Plioceno. O padrão é comparável às divergências profundas encontradas em outros gecos das formações abertas sul-americanas. Em Phyllopezus pollicaris, análises multilocus indicaram diversificação iniciada no Mioceno e persistência prolongada de linhagens em regiões isoladas da diagonal seca (Werneck et al., 2012). Em Lygodactylus, também foram reconhecidas linhagens com divergências pré-pleistocênicas associadas à história das formações abertas.

As idades devem ser consideradas hipóteses temporais preliminares, pois foram estimadas a partir de um fragmento curto, de um único locus mitocondrial, sob relógio estrito e com taxa evolutiva fixada em 0,00755 substituições por sítio por milhão de anos. Além disso, os HPD95% são relativamente amplos. As divergências mais antigas do complexo antecedem em milhões de anos a configuração relativamente recente do curso atual do rio São Francisco discutida para outras lagartixas da Caatinga. Portanto, o curso atual do rio dificilmente explica, isoladamente, a origem de todas as linhagens, embora possa ter reforçado diferenciações preexistentes ou reduzido o fluxo gênico mais recentemente.

Diversidade genética e relações haplotípicas

Foram identificados 32 haplótipos entre os 45 indivíduos analisados. O agrupamento A apresentou 20 haplótipos entre 30 indivíduos, com Hd = 0,954; a linhagem B apresentou quatro haplótipos entre cinco indivíduos, com Hd = 0,900; e o agrupamento C apresentou sete haplótipos entre oito indivíduos, com Hd = 0,964. Os dois indivíduos da linhagem D compartilharam o mesmo haplótipo (Figura 5). Não houve compartilhamento de haplótipos entre as quatro linhagens, embora tenham sido observados haplótipos compartilhados por indivíduos de diferentes localidades dentro do agrupamento A. Entre esses casos está um haplótipo registrado em Paulo Afonso e Parnamirim, além de compartilhamentos entre localidades do Rio Grande do Norte.

As distâncias genéticas médias entre as linhagens variaram de 6,3% entre A e B a 9,6% entre C e D. Foram obtidos, adicionalmente, valores de 7,4% entre A e C, 9,0% entre A e D, 8,3% entre B e C e 8,0% entre B e D (Tabela 6). Esses valores são coerentes com os ramos longos observados entre os agrupamentos na rede de haplótipos e reforçam a existência de linhagens mitocondriais profundamente diferenciadas. A rede Minimum Spanning mostrou agrupamentos internos relativamente compactos, separados por longas conexões, sugerindo a ausência de vários haplótipos intermediários na amostragem ou uma história prolongada de isolamento.

Embora distâncias mitocondriais elevadas sejam compatíveis com a hipótese de diversidade críptica, como observado em Phyllopezus por Gamble et al. (2012), elas não constituem, isoladamente, um critério de delimitação de espécies. As taxas de evolução e a diversidade intraespecífica variam entre linhagens, e a genealogia mitocondrial pode ser afetada por retenção de polimorfismo ancestral, introgressão e seleção.

Diferenciação e estrutura genética

A AMOVA hierárquica (Tabela 7) revelou estrutura genética elevada. A diferenciação entre as margens norte e sul do rio São Francisco explicou 37,49% da variação molecular total, com ΦCT = 0,37494 e p = 0,00099. A variação entre localidades dentro de cada margem correspondeu a 44,77% do total, com ΦSC = 0,71625 e p < 0,0001. Os 17,74% restantes foram atribuídos à variação dentro das localidades, resultando em ΦST global = 0,82264 e p < 0,0001.

Esses resultados indicam que a maior parte da variação genética está distribuída entre localidades e grupos geográficos, e não dentro das localidades. O valor elevado de ΦST evidencia forte diferenciação espacial das linhagens mitocondriais. Entretanto, a proporção atribuída às localidades dentro das margens foi maior do que aquela explicada pela divisão norte–sul. Portanto, o rio São Francisco contribui para a organização da diversidade, mas não é o único fator associado à estrutura genética.

Distribuição geográfica das linhagens

A distribuição espacial das linhagens mostrou uma combinação de ampla ocorrência. A linhagem A foi a mais amplamente distribuída, ocorrendo desde o Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí até Pernambuco e Bahia. Essa linhagem incluiu indivíduos de Serra das Confusões, São Raimundo Nonato, Aiuaba, Buíque, João Câmara, Parnamirim, São Bento do Norte, São Miguel do Gostoso, Paulo Afonso e Umburanas. Em contraste, a linhagem B ficou restrita a Monte Azul, no norte de Minas Gerais; a linhagem C foi encontrada apenas em Mucugê e Palmeiras, na Chapada Diamantina; e a linhagem D foi representada por Itaberaba e Elísio Medrado (Tabela 1).

A associação de B a Monte Azul e de C à Chapada Diamantina permite levantar a hipótese de que regiões serranas e suas condições ambientais tenham contribuído para a persistência e diferenciação das linhagens. Essa interpretação é compatível com resultados encontrados em lagartos saxícolas da Caatinga, nos quais linhagens microendêmicas foram associadas a formações rochosas e áreas elevadas (Werneck et al., 2015). Contudo, altitude e temperatura ainda não foram incluídas diretamente nos modelos do presente estudo e, portanto, devem ser apresentadas como hipóteses a serem testadas.

Nenhuma localidade amostrada apresentou mais de uma das quatro linhagens, de modo que não há evidência atual de coexistência local ou de uma zona de contato. As áreas situadas entre Umburanas, a Chapada Diamantina, Itaberaba e o norte de Minas Gerais representam regiões prioritárias para ampliar a amostragem e investigar possíveis transições, descontinuidades ou contatos secundários.

O papel do rio São Francisco

O teste de Mantel (Tabela 8) identificou uma correlação positiva entre as distâncias geográfica e genética (rs = 0,2364; p = 0,0176), indicando a presença de isolamento por distância. Na MRM simples, a distância geográfica também apresentou efeito significativo (β = 0,00248 por 100 km; R^2 = 0,0655; p = 0,0147), mas explicou somente 6,55% da variação. A variável que representa a localização em margens opostas

apresentou efeito mais pronunciado quando analisada isoladamente (β = 0,02449; R^2 = 0,1488; p = 0,0009).

No modelo completo, contendo simultaneamente distância geográfica e margens do rio, foram explicados 15,41% da variação genética (R^2 = 0,1541; p = 0,0038). Nesse modelo, o efeito da distância deixou de ser significativo (β = 0,00082; p = 0,5226), enquanto a posição em margens opostas permaneceu significativa (β = 0,02182; p = 0,0052). Isso sugere que, no conjunto amostrado, a separação entre margens descreve melhor a diferenciação genética do que a distância geográfica isoladamente.

Apesar disso, o rio não se comportou como uma barreira absoluta. A linhagem A ocorre nos dois lados da divisão geográfica utilizada e há compartilhamento de haplótipo entre Paulo Afonso e localidades situadas ao norte, caso a classificação de Paulo Afonso na margem sul esteja correta. Esse padrão pode refletir travessias históricas, conexões anteriores entre áreas, retenção de haplótipos ancestrais ou resolução limitada do 12S. A AMOVA também mostrou que a diferenciação entre localidades dentro das margens supera a diferença entre as margens.

A interpretação mais consistente, portanto, é a de que o São Francisco pode atuar como barreira permeável, reforçando uma estrutura que também depende da história das localidades e das linhagens. Um resultado semelhante foi encontrado em Lygodactylus klugei: duas linhagens mitocondriais foram organizadas em relação ao rio, mas os marcadores nucleares recuperaram uma única população, indicando efeito recente e incompleto da barreira (Lanna et al., 2020). Essa comparação reforça a necessidade de testar a hipótese com genes nucleares. Deve-se também confirmar, com as coordenadas dos pontos de coleta, a classificação de Paulo Afonso e de todas as localidades em relação à margem do rio antes da versão final.

História demográfica das linhagens

Para o conjunto total, o teste de Tajima (Tabela 9) apresentou D = −1,03610, sem significância estatística (p > 0,10), enquanto o Fu's Fs foi negativo (Fs = −5,708), mas não significativo segundo as simulações adotadas (p > 0,05). Esses resultados não permitem rejeitar o modelo neutro de população com tamanho constante quando todas as linhagens são analisadas conjuntamente. Além disso, a forte estrutura genética observada viola a expectativa de panmixia pressuposta pelos testes, tornando o resultado total menos informativo do que as análises realizadas separadamente por linhagem.

Na linhagem A, Tajima's D = −1,99305 (p < 0,05) e Fu's Fs = −8,95903 (p < 0,001) foram negativos e significativos. A concordância entre os dois testes indica excesso de variantes raras e de haplótipos recentes, padrão compatível com expansão populacional. Entretanto, seleção purificadora ou varreduras seletivas no genoma mitocondrial também podem produzir valores negativos, e a estrutura residual dentro do conjunto pode influenciar as estatísticas.

O agrupamento B apresentou Tajima's D = −1,18441, não significativo (p > 0,10), e o Fu's Fs não pôde ser estimado de maneira confiável, provavelmente em razão do pequeno tamanho amostral de cinco indivíduos. Na linhagem C, Tajima's D foi negativo e significativo (D = −1,62080; p < 0,05), mas Fu's Fs foi positivo e não significativo (Fs = 0,576302; p > 0,10). A discordância entre os testes não sustenta uma inferência robusta

de expansão para essa linhagem. O agrupamento D, representado por apenas dois indivíduos com sequências idênticas, não possui amostragem suficiente para análises demográficas.

Robustez das inferências

As duas corridas independentes da análise bayesiana apresentaram convergência satisfatória após a combinação dos arquivos. Os valores de ESS (Tabela 5) foram 9.061 para a posterior, 7.962 para a verossimilhança e 14.562 para o prior. Os parâmetros da árvore apresentaram ESS de 14.660 para a altura e 14.663 para o comprimento total, enquanto kappa, gammaShape, YuleModel e birthRate apresentaram valores entre 5.620 e 16.202. Todos estão muito acima do limite mínimo de 200 adotado para indicar amostragem efetiva adequada das distribuições posteriores.

A robustez do conjunto também é sustentada pela presença de 67 sítios parcimoniosamente informativos, baixa frequência de bases ambíguas, ausência de saturação detectável (Tabela 3). Esses resultados indicam que o 12S contém sinal suficiente para reconhecer as principais linhagens mitocondriais e estimar sua distribuição geográfica.

Os elevados valores de ESS, entretanto, indicam que a cadeia amostrou adequadamente o modelo especificado; eles não demonstram, por si sós, que o modelo, o relógio ou a taxa fixada sejam biologicamente corretos. A menor sustentação de alguns nós profundos, a presença de ramos internos muito curtos e o uso de um único fragmento mitocondrial mostram que a ordem das divergências e os limites de espécies permanecem menos robustos do que o reconhecimento dos quatro agrupamentos principais. Assim, os resultados fornecem evidência consistente de linhagens maternas profundamente diferenciadas e sustentam a hipótese de um complexo de espécies, mas essa hipótese ainda deverá ser testada com marcadores mitocondriais adicionais, genes nucleares, maior amostragem e evidências morfológicas ou ecológicas independentes.

Conclusão

A análise de 45 indivíduos de 15 localidades do Nordeste brasileiro e norte de Minas Gerais revelou elevada diversidade haplotípica e forte estruturação genética nas populações atribuídas a Hemidactylus brasilianus. O fragmento mitocondrial 12S apresentou baixa frequência de bases ambíguas, ausência de saturação e sítios informativos suficientes para uma investigação inicial. As inferências bayesiana e de máxima verossimilhança recuperaram quatro linhagens mitocondriais principais (A, B, C e D), embora algumas relações profundas permaneçam incertas.

A linhagem A foi a mais abundante e amplamente distribuída, enquanto B ficou restrita a Monte Azul, C a Mucugê e Palmeiras e D a Itaberaba e Elísio Medrado. Esse padrão evidencia uma linhagem de ampla ocorrência e outras regionalizadas. A influência de fatores ambientais, contudo, ainda precisa ser testada.

A divergência mais antiga no complexo foi estimada em aproximadamente 7,48 milhões de anos, situando o início de sua diversificação entre o Mioceno tardio e o Plioceno. Foram identificados 32 haplótipos, e as distâncias genéticas médias entre as linhagens variaram de 6,3% a 9,6%. A rede haplotípica apresentou agrupamentos separados por longas conexões, reforçando a existência de linhagens maternas historicamente diferenciadas.

A AMOVA atribuiu 37,49% da variação molecular às margens do rio São Francisco, 44,77% às localidades dentro das margens e 17,74% ao interior das localidades. Nas regressões sobre matrizes, a separação entre margens explicou melhor a diferenciação genética do que a distância geográfica. Entretanto, a ocorrência da linhagem A nas duas margens e o compartilhamento de haplótipos entre lados opostos mostram que o rio não constitui uma barreira impermeável. O São Francisco parece atuar como barreira permeável, influenciando a estrutura atual sem explicar sozinho a origem das linhagens, cujas divergências antecedem a configuração recente de seu curso.

Os testes demográficos não indicaram expansão significativa no conjunto total. Na linhagem A, Tajima's D e Fu's Fs negativos e significativos foram compatíveis com possível expansão recente, embora outros processos também possam gerar esse padrão. A pequena amostragem das demais linhagens limita inferências demográficas robustas.

Em conjunto, os resultados sustentam a hipótese de que H. brasilianus possa representar um complexo de linhagens profundamente diferenciadas. Isso não constitui delimitação taxonômica definitiva, pois a análise se baseia em um único fragmento mitocondrial. A ampliação da amostragem e a inclusão do CYTB, ND2 e de marcadores nucleares, como RAG1 e C-mos, serão essenciais para testar a concordância entre genealogias, o fluxo gênico e se as linhagens representam populações estruturadas ou espécies independentes.

Referências

ALJANABI, Salah M.; MARTINEZ, Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692.

AVISE, John C. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2000. ISBN: 9780674666382.

BOUCKAERT, Remco et al. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLOS Computational Biology, v. 15, n. 4, e1006650, 2019. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006650.

CARRANZA, Salvador; ARNOLD, Edwin N. Systematics, biogeography, and evolution of Hemidactylus geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 38, n. 2, p. 531–545, 2006. DOI: 10.1016/j.ympev.2005.07.012.

DARRIBA, Diego et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods, v. 9, n. 8, p. 772, 2012. DOI: 10.1038/nmeth.2109.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh340.

EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

FERNANDES, Moabe F. et al. The origins and historical assembly of the Brazilian Caatinga seasonally dry tropical forests. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 10, 723286, 2022. DOI: 10.3389/fevo.2022.723286.

GAMBLE, Tony et al. Coming to America: multiple origins of New World geckos. Journal of Evolutionary Biology, v. 24, n. 2, p. 231–244, 2011. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2010.02184.x.

GAMBLE, Tony et al. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (Phyllopezus; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America's open biomes. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 62, n. 3, p. 943–953, 2012. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.11.033.

GEHARA, Marcelo et al. Estimating synchronous demographic changes across populations using hABC and its application for a herpetological community from northeastern Brazil. Molecular Ecology, v. 26, n. 18, p. 4756–4771, 2017. DOI: 10.1111/mec.14239.

GOSLEE, Sarah C.; URBAN, Dean L. The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. Journal of Statistical Software, v. 22, n. 7, p. 1–19, 2007. DOI: 10.18637/jss.v022.i07.

GUILLORY, Wilson X. et al. Geoclimatic drivers of diversification in the largest arid and semi-arid environment of the Neotropics: perspectives from phylogeography. Molecular Ecology, v. 33, n. 14, e17431, 2024. DOI: 10.1111/mec.17431.

GUINDON, Stéphane et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010. DOI: 10.1093/sysbio/syq010.

HALL, Thomas A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, n. 41, p. 95–98, 1999.

HOANG, Diep Thi et al. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. Molecular Biology and Evolution, v. 35, n. 2, p. 518–522, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msx281.

KALYAANAMOORTHY, Subha et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nature Methods, v. 14, n. 6, p. 587–589, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4285.

KOCHER, Thomas D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 86, n. 16, p. 6196–6200, 1989. DOI: 10.1073/pnas.86.16.6196.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. Molecular Biology and Evolution, v. 41, n. 12, msae263, 2024. DOI: 10.1093/molbev/msae263.

LANNA, Flávia M. et al. The evolutionary history of Lygodactylus lizards in the South American open diagonal. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 127, p. 638–645, 2018. DOI: 10.1016/j.ympev.2018.06.010.

LANNA, Flávia M. et al. Dwarf geckos and giant rivers: the role of the São Francisco River in the evolution of Lygodactylus klugei (Squamata: Gekkonidae) in the semi-arid Caatinga of north-eastern Brazil. Biological Journal of the Linnean Society, v. 129, n. 1, p. 88–98, 2020. DOI: 10.1093/biolinnean/blz170.

LEIGH, Jessica W.; BRYANT, David. popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015. DOI: 10.1111/2041-210X.12410.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Version 4.5.3. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2026. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: 27 ago. 2026.

RAMBAUT, Andrew. FigTree. Version 1.4.4. 2018. Disponível em: https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4. Acesso em: 27 ago. 2026.

RAMBAUT, Andrew et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. Systematic Biology, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018. DOI: 10.1093/sysbio/syy032.

ROZAS, Julio et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. Molecular Biology and Evolution, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2017. DOI: 10.1093/molbev/msx248.

WERNECK, Fernanda P. et al. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'Dry Diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. Evolution, v. 66, n. 10, p. 3014–3034, 2012. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2012.01682.x.

WERNECK, Fernanda P. et al. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. BMC Evolutionary Biology, v. 15, 94, 2015. DOI: 10.1186/s12862-015-0368-3.

WONG, Thomas K. F. et al. IQ-TREE 3: phylogenomic inference software using complex evolutionary models. Molecular Biology and Evolution, v. 43, n. 5, msag117, 2026. DOI: 10.1093/molbev/msag117.

XIA, Xuhua et al. An index of substitution saturation and its application. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 26, n. 1, p. 1–7, 2003. DOI: 10.1016/S1055-7903(02)00326-3.

XIA, Xuhua. DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. Molecular Biology and Evolution, v. 35, n. 6, p. 1550–1552, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy073.

Anexos



Figura 1 – Distribuição geográfica das amostras de Hemidactylus brasilianus analisadas no Nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais.



Tabela 3 – Caracterização molecular do alinhamento do gene mitocondrial 12S de Hemidactylus brasilianus



Tabela 4 – Configurações utilizadas na inferência bayesiana das relações filogenéticas de Hemidactylus brasilianus



Tabela 5 – Diagnóstico de convergência da inferência bayesiana do gene 12S de Hemidactylus brasilianus



Figura 2 – Relações filogenéticas entre as linhagens mitocondriais de Hemidactylus brasilianus inferidas por análise bayesiana do gene 12S.



Figura 3 – Árvore de máxima verossimilhança de Hemidactylus brasilianus baseada em sequências do gene mitocondrial 12S.



Figura 4 – Árvore temporal das linhagens mitocondriais de Hemidactylus brasilianus estimada a partir do gene 12S.



Figura 5 – Rede de haplótipos do gene mitocondrial 12S de Hemidactylus brasilianus.



Tabela 6 – Distâncias genéticas médias entre as linhagens mitocondriais de Hemidactylus brasilianus e sua conversão em porcentagem com base no gene 12S.



Tabela 7 – Análise de variância molecular (AMOVA) das amostras de Hemidactylus brasilianus agrupadas entre as margens norte e sul do rio São Francisco.



Tabela 8 – Efeitos da distância geográfica e da separação pelas margens do rio São Francisco sobre a diferenciação genética de Hemidactylus brasilianus.



Tabela 9 – Testes de neutralidade no conjunto total e nas linhagens mitocondriais de Hemidactylus brasilianus.



Tabela 1 – Amostras de Hemidactylus brasilianus disponíveis para o estudo e respectivas localidades de origem.



Tabela 2 – Primers utilizados na amplificação e no sequenciamento do gene mitocondrial 12S de Hemidactylus brasilianus.

CÓDIGO: SB1043

AUTOR: ANA CLARA DE FRANCA GAMA

COAUTOR: ANDRÉA SILVA DE MEDEIROS BANDEIRA

COAUTOR: MILENA SOARES LUSTOSA

COAUTOR: MARIA LETICIA MOREIRA DA SILVA

COAUTOR: WIGINIO GABRIEL DE LIRA BANDEIRA

ORIENTADOR: EXPEDITO SILVA DO NASCIMENTO JUNIOR

TÍTULO: ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA ÁREA TEGMENTAL VENTRAL E DO CAMPO RETRORRUBRAL EM EMBRIÕES DE GALINHA (Gallus gallus domesticus)

Resumo

A dopamina integra sistemas neuromodulatórios envolvidos em funções motoras, motivacionais e de aprendizagem, sendo seus principais grupamentos mesencefálicos tradicionalmente classificados como A8, A9 e A10. Em aves, embora esses grupamentos tenham sido reconhecidos, sua organização detalhada permanece pouco esclarecida. Assim, este estudo teve como objetivo descrever a organização morfológica da área tegmental ventral (ATV/A10) e do campo retrorrubral (CRR/A8) em embriões de galinha (*Gallus gallus domesticus*) no vigésimo dia de desenvolvimento embrionário. Foram utilizados três embriões E20, cujos encéfalos foram processados para coloração de Nissl e imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH). As secções foram analisadas em microscopia de campo claro com auxílio de atlas estereotáxico. A ATV foi identificada em níveis mais rostrais do mesencéfalo, apresentando células TH-imunorreativas de formato arredondado e variação em seu padrão de distribuição ao longo da extensão rostrocaudal. O CRR foi localizado mais caudalmente e apresentou células também arredondadas, porém mais próximas umas das outras, conferindo à região formato lentiforme. Os achados demonstram que ATV/A10 e CRR/A8 podem ser reconhecidos e diferenciados neuroanatomicamente em E20 a partir de sua localização, organização e características morfológicas, contribuindo para a caracterização do sistema dopaminérgico mesencefálico em aves.

Palavras-chave: Neuroanatomia. Dopamina. Embrião de Galinha. Imuno-Histoquímica.

TITLE: MORPHOLOGICAL ORGANIZATION OF THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AND RETRORUBRAL FIELD IN CHICKEN EMBRYOS (Gallus gallus domesticus)

Abstract

Dopamine is part of neuromodulatory systems involved in motor, motivational, and learning-related functions, and its main midbrain cell groups are traditionally classified as A8, A9, and A10. In birds, although these groups have been recognized, their detailed organization remains poorly understood. Thus, this study aimed to describe the morphological organization of the ventral tegmental area (VTA/A10) and the retrorubral field (RRF/A8) in chicken embryos (*Gallus gallus domesticus*) on embryonic day 20. Three E20 embryos were used, and their brains were processed for Nissl staining and tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry. Sections were analyzed under bright-field microscopy with the aid of a stereotaxic atlas. The VTA was identified at more rostral midbrain levels and contained rounded TH-immunoreactive cells with variation in their distribution pattern along the rostrocaudal axis. The RRF was located more caudally and also contained rounded cells, which were more closely arranged, giving the region a lentiform appearance. These findings show that the VTA/A10 and RRF/A8 can be neuroanatomically recognized and differentiated at E20 based on their location, organization, and morphological characteristics, contributing to the characterization of the avian midbrain dopaminergic system.

Keywords: Neuroanatomy. Dopamine. Chick embryo. Immunohistochemistry.

Introdução

A dopamina (DA) constitui um importante neuromodulador do sistema nervoso central, participando da regulação de funções relacionadas ao controle motor, à motivação, à aprendizagem e ao processamento de recompensas (Liu; Goel; Kaeser, 2021; Fujita *et al.*, 2022). No encéfalo, os neurônios dopaminérgicos se organizam em grupamentos celulares distribuídos em diferentes regiões, cuja classificação em séries numeradas permanece utilizada para a descrição desses sistemas e para a comparação entre espécies (Björklund; Dunnett, 2007). Entre esses grupamentos, aqueles localizados no mesencéfalo integram sistemas de projeção que alcançam diferentes regiões do prosencéfalo e participam da modulação de funções motoras e motivacionais (Yetnikoff *et al.*, 2014; Fujita *et al.*, 2025).

No mesencéfalo ventral, os principais grupamentos dopaminérgicos são tradicionalmente classificados como A8, A9 e A10, associados, respectivamente, ao campo retrorrubral (CRR), à substância negra (SN) e à área tegmental ventral (ATV), compondo o complexo dopaminérgico mesencefálico (Yetnikoff *et al.*,

2014; Lu *et al.*, 2024). Apesar da utilidade dessa organização clássica, essas populações apresentam importante heterogeneidade quanto às características anatômicas, moleculares, eletrofisiológicas e de conectividade (Lu *et al.*, 2024). Dentro desse complexo, a ATV/A10 constitui importante origem de projeções mesocorticolímbicas, enquanto o CRR corresponde ao território que abriga o grupamento A8 (Liu; Goel; Kaeser, 2021; German; Manaye, 1993).

Em aves, também foram identificados grupamentos mesencefálicos correspondentes a A8, A9 e A10, com semelhanças anatômicas e de conectividade em relação aos sistemas descritos em mamíferos (Fujita *et al.*, 2022). Em galinhas, estudos imunocitoquímicos demonstraram que grande parte dos pericários imunorreativos à DA e à L-DOPA se concentra no tegmento mesencefálico, incluindo a área ventral de Tsai, considerada homóloga à ATV dos mamíferos (Moons *et al.*, 1994). Entretanto, embora exista conservação de aspectos gerais da organização dopaminérgica, diferenças moleculares também foram demonstradas em aves, levando à necessidade de reavaliar o grau de correspondência entre os sistemas aviário e mamaliano (Fujita *et al.*, 2022; Fujita *et al.*, 2025). Nesse sentido, a caracterização direta dessas populações em aves permite descrevê-las a partir de características próprias do grupo, sem depender exclusivamente da extrapolação de modelos mamíferos.

Considerando a investigação do sistema dopaminérgico (SD) aviário ao longo do desenvolvimento, o embrião de galinha (EG) constitui um modelo útil por apresentar curto período de incubação, fácil acesso ao organismo em formação e controle preciso dos estágios embrionários (Kaplan-Arabaci; Dančišinová; Paulsen, 2025). Durante a embriogênese, neurônios contendo catecolaminas podem ser identificados a partir do nono dia de incubação, enquanto modificações morfológicas e topográficas continuam sendo observadas ao longo do desenvolvimento (Guglielmone; Panzica, 1984). Em estágios mais tardios, alterações no SD permanecem presentes, com concentrações de DA relativamente estáveis entre E12 e E16, aumento entre E16 e E19 e redução antes da eclosão (Huang *et al.*, 2019). Assim, o período embrionário tardio se apresenta como uma etapa pertinente para a análise da sua organização dopaminérgica.

Apesar do reconhecimento dos principais grupamentos dopaminérgicos mesencefálicos em aves, sua distribuição detalhada ainda permanece pouco esclarecida (Fujita *et al.*, 2022). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo descrever a organização morfológica da ATV/A10 e do CRR/A8 em EG (*Gallus gallus domesticus*) no vigésimo dia de desenvolvimento embrionário.

Metodologia

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN), sob o protocolo nº 055/2024.

2.1 Animais e incubação

Foram utilizados três EG (*Gallus gallus domesticus*) com 20 dias de desenvolvimento, sem distinção de sexo e massa corporal entre 50 e 65g. Os ovos fertilizados, adquiridos um dia após a postura, foram incubados a 37,5°C e umidade relativa de 75%, sem rotação, sendo o desenvolvimento acompanhado durante os 20 dias por ovoscopia.

2.2 Eutanásia e perfusão transcardíaca

No vigésimo dia, os embriões foram eutanasiados por via intracelomática com 15mg de cetamina e 3,375mg de xilazina por embrião, correspondentes a três vezes as doses anestésicas (Horr *et al.*, 2023). Após a verificação dos reflexos, realizou-se toracotomia, cardiopunção do ventrículo esquerdo e incisão do átrio direito, conectando-se a agulha a uma bomba peristáltica. Inicialmente, foi perfundida solução salina a 0,9% contendo EDTA (Bioclin®, 200 gotas/1000mL de solução salina), a 30 mL/min por 5 minutos, para exsanguinação e lavagem do leito vascular. Em seguida, foi perfundido paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4), a 30mL/min por 5 minutos e, posteriormente, a 15mL/min por 10 minutos.

2.3 Remoção dos encéfalos e microtomia

Após a perfusão, os embriões foram decapitados e os encéfalos removidos. A retirada das meninges foi realizada sob estereomicroscópio Motic SMZ-168. Os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído a 4% durante a noite, mantidos em fixador sacarose a 30% durante a noite e, posteriormente, em tampão com sacarose a 30%, a 4°C, até a microtomia. Foram então incluídos em Tissue-Tek OCT® e seccionados coronalmente em criostato Leica CM1860 UV, a -20°C, em cortes de 40µm. As secções foram distribuídas em três compartimentos, de maneira uniforme e alternada, de modo a favorecer a obtenção de três compartimentos representativos, mantendo-se 80µm entre secções do mesmo compartimento. De cada EG, um compartimento foi destinado à coloração de Nissl e outro à imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), ambos mantidos em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) até o processamento. O terceiro foi armazenado em solução anticongelante.

2.4 Coloração de Nissl

As secções destinadas ao método de Nissl foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas. O processamento seguiu, em sequência, desidratação em álcoois crescentes, diafanização em xilol, reidratação em álcoois decrescentes, coloração com tionina, passagem em água destilada e álcoois crescentes e montagem das lamínulas com Entellan®. As lâminas foram utilizadas para avaliação citoarquitetônica, auxiliando a identificação e caracterização das células quanto à forma, distribuição e tamanho.

2.5 Imuno-histoquímica para TH

A imuno-histoquímica foi realizada em secções em livre flutuação (*free floating*). Inicialmente, os cortes passaram por três lavagens de 10 minutos em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4), sob agitação orbital, seguidas de pré-tratamento com borohidreto de sódio a 1% por 15 minutos e quatro novas lavagens de 10 minutos. Em seguida, realizou-se o bloqueio de sítios inespecíficos com leite bovino desnatado a 5% por 10 minutos. As secções foram então incubadas por 18 a 24 horas, a 20°C e 40-50rpm, com anticorpo primário IgG anti-TH produzido em coelho (Abcam®), diluído a 1:1000 em solução contendo soro normal de camundongo a 2% e Triton X-100 a 0,4%.

Após três lavagens de 10 minutos, as secções foram incubadas por 90 minutos, a 20°C e 40-60rpm, com anticorpo secundário biotinilado anti-coelho obtido em camundongo (Sigma-Aldrich®), diluído a 1:1000 em Triton X-100 a 0,4%. Após três novas lavagens, foram incubadas por 90 minutos no complexo avidina-biotina-peroxidase ABC Elite® (Vector Labs), diluído a 1:100 em Triton X-100 a 0,4% contendo NaCl; a solução foi preparada 30 minutos antes da incubação. Ao final, realizaram-se três lavagens de 10 minutos.

Para a revelação, uma alíquota de 1mL de DAB a 25mg/mL foi diluída em 99mL de tampão fosfato (0,1M, pH 7,4), resultando em concentração final de DAB de 0,25mg/mL. As secções permaneceram nesta solução por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se H_2O_2, atingindo concentração final de 0,003%, e a reação foi acompanhada visualmente por 2 a 6 minutos, até o tecido adquirir coloração castanha, sendo interrompida por três lavagens de 10 minutos. Ao final, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e secas à temperatura ambiente por aproximadamente uma semana. Em seguida, foram desidratadas em álcool 70%, 95% e duas passagens em álcool absoluto, por 5 minutos cada, diafanizadas em duas passagens de xilol por 5 minutos e recobertas com lamínulas utilizando Entellan®.

2.6 Microscopia e análise morfológica

As secções de Nissl e de imuno-histoquímica para TH foram examinadas sob iluminação de campo claro em microscópio Nikon. A identificação e delimitação dos núcleos foram realizadas com auxílio do atlas estereotáxico *The Chick Brain* (Puelles *et al.*, 2018), utilizando conjuntamente a distribuição das células imunorreativas à TH e a citoarquitetura evidenciada nas secções coradas por Nissl. Neste estudo, a análise foi direcionada à ATV e ao CRR. Para a análise morfológica qualitativa, foi observada uma área representativa de cada região, considerando a morfologia das células imunorreativas à TH e as descrições anteriores dos núcleos dopaminérgicos do tronco encefálico de pintos, galinhas e mamíferos.

Resultados e Discussões

A análise das secções submetidas à imuno-histoquímica para TH, em associação à coloração de Nissl, possibilitou estabelecer os limites anatômicos e caracterizar a organização citoarquitetônica dos grupamentos dopaminérgicos mesencefálicos. Considerando o recorte deste estudo, foram analisadas a ATV e o CRR, distribuídos em diferentes níveis ao longo do eixo rostrocaudal, com a ATV localizada mais rostralmente e o CRR identificado em níveis mais caudais do mesencéfalo.

3.1 Área tegmental ventral (ATV/A10)

A ATV foi identificada na região medial do tegmento mesencefálico, lateralmente ao terceiro ventrículo (3V), logo após seu estreitamento, aproximadamente no nível estereotáxico AP = 0,64mm. Em secções intermediárias, as células imunorreativas à TH distribuíram-se ao redor da fossa interpeduncular (ipf), posicionadas ventralmente ao núcleo pré-Edinger-Westphal (pEW), dorsalmente ao hipotálamo e medialmente à parte parvicelular do núcleo rubro (RPC) e à substância negra (Figura 1A-C).

Em níveis mais caudais, observou-se uma modificação nessa organização, com tendência de concentração das células na porção mediana do assoalho mesencefálico, adjacente lateralmente à parte magnocelular do núcleo rubro (RMC).

Quanto às características morfológicas, as células imunorreativas à TH presentes na ATV apresentaram formato arredondado, sendo observada também uma diferença em sua disposição ao longo da própria extensão da região. Nos níveis intermediários, distribuíram-se circundando a fossa interpeduncular, enquanto, nas secções mais caudais, apresentaram uma organização no sentido dorsoventral (Figura 2A-C). Dessa forma, a identificação da ATV no material analisado não esteve associada apenas à presença da imunorreatividade à TH, mas também à posição ocupada no tegmento mesencefálico, às relações estabelecidas com as estruturas adjacentes e às modificações do agrupamento celular nos diferentes níveis avaliados.

Os dados obtidos apresentam correspondência com descrições anteriores do SD em galinhas. Moons *et al.* (1994), ao estudarem a distribuição de células imunorreativas à DA e à L-DOPA, identificaram na transição entre o hipotálamo e o mesencéfalo um amplo grupamento celular localizado na área ventralis of Tsai, considerada homóloga à ATV dos mamíferos. Essa região foi descrita lateralmente aos nervos oculomotores e constituída por grande número de pericários imunorreativos, enquanto, de modo geral, as células mesencefálicas apresentaram tamanho médio e formatos arredondados a ovais, sendo frequentemente multipolares (Moons *et al.*, 1994). Assim, a posição mesencefálica e a morfologia predominantemente arredondada observadas em E20 acompanham características já identificadas na organização dopaminérgica de galinhas.

Ademais, a variação observada na disposição das células imunorreativas à TH entre os níveis intermediários e caudais da ATV evidencia que sua organização espacial se modifica ao longo do eixo rostrocaudal. Essa característica pode ser

comparada à organização descrita em mamíferos, nos quais os grupos A8, A9 e A10 apresentam continuidade espacial e regiões de transição entre si, como ilustrado por Yetnikoff *et al.* (2014) no mesencéfalo de rato. Deste modo, a utilização conjunta da marcação para TH, da citoarquitetura e dos marcos anatômicos torna-se particularmente importante na identificação de uma região cuja configuração se modifica ao longo de sua extensão, permitindo acompanhar o grupamento celular sem pressupor que sua disposição permaneça constante em todos os níveis.

No contexto das aves, Fujita e colaboradores (2022) também identificaram células com forte expressão de TH e DOPA-descarboxilase (DDC) na ATV de pintos, além de demonstrarem a distribuição dos grupamentos A8, A9 e A10 no mesencéfalo, resultados que os próprios autores consideraram concordantes com estudos anteriores realizados em aves. Dessa forma, os achados do presente estudo inserem a organização observada em E20 em um padrão anatômico já reconhecido para o SD de galinhas, acrescentando a descrição da posição, das relações anatômicas e da organização geral das células TH-imunorreativas da ATV durante o período embrionário tardio.

3.2 Campo retrorrubral (CRR/A8)

Seguindo a análise no sentido rostrocaudal, o CRR foi identificado posteriormente, aproximadamente no nível estereotáxico AP = -1,28mm. A região apresentou-se ventralmente à substância cinzenta periaquedutal mesencefálica (mPAG), dorsalmente à formação reticular mesencefálica (mRt) e lateralmente ao núcleo de Edinger-Westphal (EW) e ao núcleo oculomotor (3N). As células imunorreativas à TH apresentaram formato arredondado e encontravam-se mais próximas anatomicamente quando comparadas àquelas observadas na ATV, organização que conferiu ao CRR um formato lentiforme nas secções analisadas (Figura 3A-C).

A presença de uma população correspondente ao grupo A8 no mesencéfalo aviário também é descrita em estudos anteriores. Fujita *et al.* (2022) identificaram no tronco encefálico de pintos células com expressão de TH e DDC no grupamento A8 e demonstraram sua presença juntamente aos grupamentos A9 e A10, confirmando sua identificação dentro da organização dopaminérgica mesencefálica de aves. A descrição realizada em E20 complementa esse panorama ao evidenciar, além da imunorreatividade à TH, os referenciais anatômicos utilizados para a localização do CRR e a disposição apresentada por suas células, cuja maior proximidade conferiu ao agrupamento uma configuração distinta daquela observada na ATV.

A organização do A8 como um território próprio dentro do complexo dopaminérgico também é amplamente reconhecida em outros vertebrados estudados. German e Manaye (1993), ao realizarem a reconstrução dos grupamentos dopaminérgicos mesencefálicos no rato, localizaram as células A8 no campo retrorrubral e estabeleceram seus limites a partir da forma e disposição dos agrupamentos celulares, de sua relação com estruturas adjacentes e da comparação com atlas neuroanatômico. Embora a organização dessas populações apresente particularidades entre espécies, esse conjunto de

parâmetros se aproxima da abordagem empregada no presente estudo, no qual a identificação do CRR resultou da associação entre imunorreatividade, citoarquitetura e topografia, e não de uma característica celular isolada.

Nesse aspecto, a comparação entre as duas regiões analisadas também evidencia diferenças em sua organização. Tanto na ATV quanto no CRR foram descritas células imunorreativas à TH de formato arredondado mas diferiram quanto à disposição celular. A ATV apresentou variação na disposição celular ao longo dos níveis analisados, passando de uma distribuição circundante à fossa interpeduncular para uma organização dorsoventral nas secções mais caudais, enquanto, no CRR, as células foram descritas mais próximas entre si, conferindo o aspecto lentiforme do agrupamento. Assim, a morfologia celular, quando considerada juntamente à distribuição e à posição neuroanatômica, contribuiu para a caracterização diferencial das duas regiões.

De maneira geral, a identificação da ATV/A10 e do CRR/A8 em E20 acompanha o conhecimento já estabelecido acerca da presença dos principais grupamentos dopaminérgicos no mesencéfalo das aves. Estudos clássicos com galinhas já demonstravam ampla representação de células relacionadas ao SD no tegmento mesencefálico (Moons *et al.*, 1994), enquanto análises mais recentes confirmaram em pintos a distribuição das populações A8, A9 e A10 por meio de marcadores moleculares relacionados ao fenótipo dopaminérgico (Fujita *et al.*, 2022). Ainda, Fujita *et al.* (2022), com base nos estudos de desenvolvimento disponíveis, destacam que a formação embrionária do sistema catecolaminérgico encontra-se quase completa antes da eclosão, situando o período analisado neste trabalho em uma etapa tardia da organização desses sistemas.

Nesse sentido, a análise de embriões no vigésimo dia de desenvolvimento permitiu observar uma organização em que ATV e CRR se apresentavam reconhecíveis a partir de sua topografia e das características celulares descritas. A ATV ocupou níveis mais rostrais, apresentou relações próprias com a fossa interpeduncular, terceiro ventrículo e núcleo rubro, além de variação na disposição das células ao longo de sua extensão. Por sua vez, o CRR foi localizado mais caudalmente, relacionado à substância cinzenta periaquedutal, formação reticular mesencefálica e núcleos de Edinger-Westphal e oculomotor, apresentando células mais próximas entre si e configuração lentiforme. Em conjunto, esses elementos possibilitaram a caracterização neuroanatômica das duas regiões no material embrionário analisado e demonstraram diferentes padrões de organização entre a ATV e o CRR em EG.

Conclusão

Neste estudo, foi descrita a organização morfológica da área tegmental ventral (ATV/A10) e do campo retrorrubral (CRR/A8) em EG no vigésimo dia de desenvolvimento embrionário. A ATV foi identificada em níveis mais rostrais do mesencéfalo, apresentando células imunorreativas à TH de formato

arredondado e diferentes padrões de distribuição ao longo de sua extensão. O CRR, por sua vez, foi localizado mais caudalmente e apresentou células também arredondadas, porém mais próximas anatomicamente, conferindo à região um formato lentiforme.

Os dados obtidos demonstram que ATV/A10 e CRR/A8 podem ser reconhecidos e diferenciados neuroanatomicamente em E20 a partir de sua localização, organização e características morfológicas. Dessa forma, os achados contribuem para a caracterização desses grupamentos no período embrionário tardio e para a compreensão da organização do SD mesencefálico em aves.

Referências

BJÖRKLUND, Anders; DUNNETT, Stephen B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194-202, 2007. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006.

FUJITA, Toshiyuki et al. Dopaminergic nuclei in the chick midbrain express serotonin receptor subfamily genes. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 1030621, 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.1030621.

FUJITA, Toshiyuki et al. Molecular characterization of chicken DA systems reveals that the avian personality gene, DRD4, is expressed in the mitral cells of the olfactory bulb. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 19, 1531200, 2025. DOI: 10.3389/fnana.2025.1531200.

GERMAN, Dwight C.; MANAYE, Kebreten F. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 331, n. 3, p. 297-309, 1993.

GUGLIELMONE, R.; PANZICA, G. C. Typology, distribution and development of the catecholamine-containing neurons in the chicken brain. **Cell and Tissue Research**, v. 237, p. 67-79, 1984.

HORR, Mônica et al. A fast and simple protocol to anaesthesia in chicken embryos. **Experimental animals**, v. 72, n. 3, p. 294-301, 2023.

HUANG, Xiaohong et al. The development of the serotonergic and dopaminergic systems during chicken mid-late embryogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 493, 110472, 2019. DOI: 10.1016/j.mce.2019.110472.

KAPLAN-ARABACI, Oykum; DANČIŠINOVÁ, Zuzana; PAULSEN, Ragnhild Elisabeth. The chicken embryo: an alternative animal model in development, disease and pharmacological treatment. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 13, e70086, 2025. DOI: 10.1002/prp2.70086.

LIU, Changliang; GOEL, Pragya; KAESER, Pascal S. Spatial and temporal scales of dopamine transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, p. 345-358, 2021. DOI: 10.1038/s41583-021-00455-7.

LU, Xiaying et al. Heterogeneity of mesencephalic dopaminergic neurons: from molecular classifications, electrophysiological properties to functional connectivity. **The FASEB Journal**, v. 38, e23465, 2024. DOI: 10.1096/fj.202302031R.

MOONS, Lieve et al. Immunocytochemical localization of L-DOPA and dopamine in the brain of the chicken (Gallus domesticus). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 346, p. 97-118, 1994.

PUELLES, Luis et al. The chick brain in stereotaxic coordinates and alternate stains: featuring neuromeric divisions and mammalian homologies. **Academic Press**, 2018.

YETNIKOFF, L. et al. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. **Neuroscience**, v. 282, p. 23-48, 2014. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.010.

Anexos



(A) Secção coronal evidenciando a localização da ATV/A10. (B) Detalhe da região da ATV/A10, evidenciando a distribuição das células imunorreativas à TH ao redor da fossa interpeduncular. (C) Detalhe das células imunorreativas à TH na ATV/A10.



(A) Secção coronal evidenciando a localização da ATV/A10. (B) Detalhe da região da ATV em nível mais caudal. (C) Detalhe das células imunorreativas à TH, evidenciando sua disposição no sentido dorsoventral.



(A) Secção coronal evidenciando a localização do CRR/A8. (B) Detalhe da região do CRR/A8. (C) Detalhe das células imunorreativas à TH no CRR/A8.

CÓDIGO: SB1068

AUTOR: ANA LETICIA BARBOSA SILVA

ORIENTADOR: RENATA DE FÁTIMA PANOSSO

TÍTULO: Extratos de cianobactéria neurotóxica inibem o desenvolvimento de Aedes aegypti?

Resumo

As cianobactérias são microrganismos com muitas espécies capazes de produzir cianotoxinas as quais causam efeitos sobre diferentes organismos. Entre essas espécies, Sphaerospermopsis torques-reginae apresenta produção de compostos neurotóxicos, despertando interesse quanto aos seus efeitos tóxicos. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de extrato de cianobactéria sobre o desenvolvimento de Aedes aegypti. O desenvolvimento foi acompanhado da fase larval até a emergência dos adultos, bem como a observação da postura de ovos. Até o nono dia do experimento, 26,7% das larvas progrediram para a fase de pupa, enquanto os tratamentos com extrato apresentaram valores próximos ao dobro, indicando aceleração do desenvolvimento do mosquito em relação ao controle. Os resultados demonstram que a exposição ao extrato da cianobactéria não apresentou, inicialmente, efeito inibitório sobre o desenvolvimento de A. aegypti; pelo contrário, a exposição esteve associada à aceleração desse processo.

Palavras-chave: Aedes aegypti; Cianobactérias; Cianotoxinas; Desenvolvimento larval

TITLE: Do extracts of neurotoxic cyanobacteria inhibit the development of Aedes aegypti?

Abstract

Cyanobacteria are microorganisms, many species of which are capable of producing cyanotoxins that exert effects on different organisms. Among these species, Sphaerospermopsis torques-reginae produces neurotoxic compounds, raising concerns regarding its toxic effects. In this context, the present study aimed to evaluate the effects of different concentrations of cyanobacterial extract on the development of Aedes aegypti. Development was monitored from the larval stage through adult emergence, as well as egg-laying activity. By the ninth day of the experiment, 26.7% of the larvae had progressed to the pupal stage, whereas treatments with cyanobacterial extract showed

values nearly twice as high, indicating accelerated mosquito development compared with the control. These results demonstrate that exposure to the cyanobacterial extract did not initially have an inhibitory effect on A. aegypti development; rather, exposure was associated with an acceleration of this process.

Keywords: Aedes aegypti; Cyanobacteria; Cyanotoxins; Larval development

Introdução

O mosquito Aedes aegypti é um importante vetor de arboviroses de interesse para a saúde pública, apresentando ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Seu ciclo de vida envolve as fases de ovo, larva, pupa e adulto, sendo o desenvolvimento das formas imaturas dependente de condições ambientais, disponibilidade de alimento e características do criadouro. Dessa forma, alterações na qualidade da água podem interferir diretamente no desenvolvimento do mosquito.

Entre os organismos presentes em ambientes aquáticos, destacam-se as cianobactérias, microrganismos fotossintetizantes capazes de produzir uma ampla diversidade de metabólitos secundários. Algumas espécies podem produzir cianotoxinas com diferentes mecanismos de ação e efeitos sobre organismos aquáticos e terrestres. A espécie Sphaerospermopsis torques-reginae, por exemplo, possui neurotoxina.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de extrato de cianobactéria neurotóxica sobre o desenvolvimento de larvas de Aedes aegypti, acompanhando os indivíduos desde o terceiro estádio larval até a fase de pupa. Buscou-se verificar se a exposição ao extrato poderia alterar a velocidade de desenvolvimento do mosquito e se a disponibilidade de alimento influencia essa resposta.

Metodologia

Para a execução deste trabalho foi utilizada uma cepa da cianobactéria Sphaerospermopsis torques-reginae isolada de um açude da região semiárida e obtida a partir do banco de cultivo de cianobactérias da Universidade Federal de Agreste de Pernambuco, UFAPE, Garanhuns, PE.

No Laboratório de Microbiologia Aquática (LAMAq) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), a cianobactéria será mantida em cultivo semicontínuo utilizando-se meio Wright's Cryptophyte (WC), previamente esterilizado, alocado em frascos tipo erlenmeyers sob temperatura de 23 ºC (± 1ºC) e radiação luminosa de 2,5 µmol quanta m−2 s−1 em ciclos de 12:12 horas claro:escuro (Leitão et al. 2018). O cultivo será mantido em crescimento exponencial por meio de diluições periódicas com meio WC.

O experimento foi realizado utilizando larvas de Aedes aegypti no terceiro estádio larval (L3). Os indivíduos foram submetidos a cinco tratamentos, correspondentes ao controle, contendo 0% de extrato, e às concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% de extrato de cianobactéria. Cada tratamento possuía três réplicas.

Em uma parcela experimental, os organismos receberam ração, enquanto na outra não houve ração. Dessa forma, foram utilizadas 15 unidades experimentais com ração e 15 sem ração, totalizando 30 unidades experimentais.

Após a aplicação dos tratamentos, o desenvolvimento dos organismos foi acompanhado desde o estádio L3 até a emergência dos adultos. Durante o experimento foram observadas as mudanças de estágio, considerando-se o desenvolvimento larval, a formação de pupas e a emergência dos adultos. Posteriormente, os adultos foram acompanhados quanto à ocorrência de postura de ovos.

Os dados obtidos foram organizados de acordo com os tratamentos e as condições de alimentação, permitindo comparar o desenvolvimento dos organismos expostos às diferentes concentrações do extrato com o grupo controle. A velocidade de desenvolvimento foi avaliada a partir da progressão dos indivíduos entre os diferentes estágios do ciclo de vida.

Resultados e Discussões

A exposição aos extratos da cianobactéria S. Torques-reginae não causou imobilidade ou mortandade das larvas de A. aegypti nas condições testadas. Os resultados obtidos demonstraram diferenças no desenvolvimento de Aedes aegypti entre o grupo controle e os tratamentos com o extrato de cianobactéria.

Até o nono dia do experimento, 26,7% das larvas progrediram para a fase de pupa no tratamento controle (sem exposição). Já nos tratamentos submetidos às diferentes concentrações do extrato, até o nono dia, entre 40% e 56,7% das larvas desenvolveram-se em pupas.

Esse resultado indica que a exposição ao extrato não causou uma inibição do desenvolvimento das larvas. Ao contrário, foi observada uma aceleração do desenvolvimento nos grupos expostos ao extrato. Esse comportamento demonstra que a interação entre toxinas de cianobactérias e organismos aquáticos pode apresentar respostas diferentes daquela inicialmente esperada para uma substância neurotóxica.

A comparação entre os tratamentos com e sem alimento também mostram que a alimentação interfere na resposta dos organismos à exposição ao extrato. A análise dessas variáveis é importante, uma vez que o desenvolvimento de A. aegypti pode ser influenciado tanto pelas características do ambiente quanto pela disponibilidade de recursos.

Conclusão

Até o momento, podemos concluir que o extrato de cianobactéria não promoveu inibição do desenvolvimento de Aedes aegypti. Pelo menos nas condições estudadas, o uso dos metabólitos da cianobactéria S. torques-reginae não se mostrou viável para o controle do mosquito. Pelo contrário, o extrato causou aceleração do seu ciclo de vida. Análises futuras devem avaliar se ambientes contendo cianobactérias neurotóxicas podem potencializar a reprodução de A. aegypti.

A realização do experimento em condições com e sem alimento permitiu ainda considerar a influência da condição nutricional sobre a resposta dos organismos. Dessa forma, os resultados reforçam a importância de investigar os efeitos de metabólitos de cianobactérias sobre organismos de importância sanitária e suas possíveis influências em ambientes aquáticos.

Referências

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/sdgs. Acesso em: 26 de agosto de 2026.

Śliwińska-Wilczewska, Sylwia. The current state of knowledge on taxonomy, modulating factors, ecological roles, and mode of action of phytoplankton allelochemic.

ELSEVIER. Volume 773, 15 June 2021, 145681. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972100749X?via%3Dihub. Acesso em: 27 de agosto de 2026.

CÓDIGO: SB1073

AUTOR: MARIA EDUARDA GALVAO FERNANDES

ORIENTADOR: JOSELIO MARIA GALVAO DE ARAUJO

TÍTULO: Caracterização genética dos arbovírus identificados no Estado do Rio Grande do Norte (2025-2026)

Resumo

A dengue é uma doença infecciosa reemergente no Brasil, presente no país há cerca de quatro décadas. No país e no estado do Rio Grande do Norte (RN) as arboviroses permanecem tendo grande impacto na saúde pública e preocupam as autoridades. Nesse estudo, foi feita a análise da situação epidemiológica dos arbovírus circulantes no estado do RN e a análise filogenética da nova linhagem do Vírus Dengue Tipo 2 identificado em 2025. Os resultados da reconstrução filogeográfica revelaram que a nova linhagem circulante do genótipo Cosmopolita do DENV-2 identificado no Rio Grande do Norte foi proveniente da cidade de Limpio, Paraguay. Do Paraguai, antes de ser detectado em Tibau do Sul no Rio Grande do Norte, o vírus circulou em São Paulo, nos municípios de Guarulhos e Piracicaba. A nossa análise também permitiu o sequenciamento, mapeamento e modelagem das mutações nas proteínas estruturais do envelope (E), do capsídeo (C), e do precursor de membrana (prM) da nova linhagem para a característica genética e bioquímica dessas estruturas. Ao total, foram identificadas 30 substituições, 15 delas na proteínas E, caracterizada por ser a estrutura onde a maioria dos anticorpos neutralizadores do sistema imunológico agem. Além disso, foram realizadas também análises in silico de predição de epítopos, a partir de uma sequência do RN que indicaram uma conservação relevante do potencial antigênico da proteína E, com variações pontuais no repertório predito.

Palavras-chave: Dengue, Imunoinformática, Proteínas estruturais, Rio Grande do Norte.

TITLE: Genetic characterization of arboviruses identified in the State of Rio Grande do Norte (2025-2026)

Abstract

Dengue is a re-emerging infectious disease in Brazil, present in the country for about four decades. In the country and in the state of Rio Grande do Norte (RN), arboviruses continue to have a major impact on public health and worry authorities. In this study, we analyzed the epidemiological situation of circulating arboviruses in the state of RN and performed a phylogenetic analysis of the new lineage of Dengue Virus Type 2

identified in 2025. The results of the phylogeographic reconstruction revealed that the new circulating lineage of the DENV-2 Cosmopolitan genotype identified in Rio Grande do Norte originated from the city of Limpio, Paraguay. From Paraguay, before being detected in Tibau do Sul in Rio Grande do Norte, the virus circulated in São Paulo, in the municipalities of Guarulhos and Piracicaba. Our analysis also allowed the sequencing, mapping, and modeling of mutations in the structural envelope (E), capsid (C), and membrane precursor (prM) proteins of the new lineage to determine the genetic and biochemical characteristics of these structures. In total, 30 substitutions were identified, 15 of them in the E protein, which is characterized as the structure where most neutralizing antibodies of the immune system act. In addition, in silico epitope prediction analyses were performed based on an RN sequence, which indicated a relevant conservation of the antigenic potential of the E protein, with occasional variations in the predicted repertoire.

Keywords: Dengue, Immunoinformatics, Structural proteins, Rio Grande do Norte.

Introdução

Arboviroses são doenças infecciosas virais transmitidas entre humanos por vetores artrópodes. Os principais arbovírus circulantes no Estado do Rio Grande do Norte (RN) pertencem ao gênero Flavivirus, como os vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV), febre amarela (VFA) e do gênero Alphavirus, o vírus Chikungunya (CHIKV), ambos transmitidos pelo mesmo vetor, o Aedes aegypti. Esses são os causadores mais comuns de doenças infecciosas circulantes em regiões tropicais de áreas urbanas, como é o caso de países localizados na Ásia e América Latina, a qual se inclui o Brasil/RN. O cenário epidemiológico do vírus da dengue (DENV) preocupa autoridades de saúde ao redor do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 21 de agosto de 2025, estimou, com base nos casos clínicos confirmados e em suspeita, oficialmente notificados pelos Ministérios da Saúde, que cerca de metade da população global está em risco de dengue, com uma estimativa de 100 a 400 milhões de infecções a cada ano. Essa previsão dada pela OMS é preocupante, pois apresenta uma tendência geral para compreender o comportamento epidemiológico do vírus da dengue no mundo. É importante ressaltar que o Rio Grande do Norte já apresentou cenários epidêmicos de diferentes arboviroses e atualmente é classificada como uma doença reemergente nos boletins epidemiológicos publicados pela Secretaria Estadual de Saúde/RN. Mutações no genoma do DENV podem afetar significativamente sua virulência, transmissibilidade e interação com o sistema imunológico do hospedeiro. A estrutura do vírus da Dengue é constituída por proteínas estruturais que são o envelope (E), capsídeo (C) e precursor de membrana (prM). A proteína E, localizada na superfície do vírus, possui três domínios estruturais (DI, DII e DIII), os quais possuem funções específicas na sua estrutura e na infectividade viral, como por exemplo, a replicabilidade viral, sensibilidade ao pH, fusão de membranas devido a presença de epítopos imunodominantes (Zhang et al. 2017). Por ser a proteína estrutural mais externa, conhecer as suas mutações ajuda a compreender o comportamento do vírus, sendo de grande relevância para pesquisas no desenvolvimento de vacinas e terapias antivirais. Nesse estudo, realizamos a análise da situação epidemiológica dos arbovírus circulantes no estado do Rio Grande do Norte, com ênfase no novo genótipo do vírus Dengue tipo 2 (DENV-2) circulante no ano de 2025 e 2026. E o sequenciamento das proteínas estruturais, o envelope, o capsídeo e o

precursor de membrana do genoma viral para a caracterização genética, análises filogenéticas e predição de epítopos de imunoinformática.

Metodologia

3.1. Análise Epidemiológica O estudo da situação epidemiológica dos arbovírus circulantes no estado do Rio Grande Norte foi possível a partir da análise dos boletins epidemiológicos disponíveis no site da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande Norte. 3.2. Análise filogenética e mapeamento filogeográfico do DENV-2. A análise do novo genótipo do DENV-2 circulante no Rio Grande do Norte (RN) foi possível a partir da coleta das sequências nucleotídicas disponíveis no banco de dados Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). As sequências foram submetidas ao Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), para a coleta das sequências mais similares similares. A partir do resultado do BLAST, as sequências mais similares foram coletadas no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), juntamente com as informações de local de coleta. Além dessas sequências com maior similaridade, foram coletadas sequências referências de todos os genótipos do DENV-2 (Ujwal et al., 2019). O banco no formato FASTA foi submetido ao alinhamento múltiplo utilizando o Clustal W do programa Mega v12.0.9. Após isso, foi realizada a edição do alinhamento e análise filogenética. 3.3. Identificação e caracterização das mutações do DENV-2 Foram separados apenas as proteínas estruturais do vírus, que são o envelope (E), capsídeo (C) e precursor de membrana (prM) com base nas localizações dos aminoácidos da sequência referência do GenBank NCBI: Vírus da dengue 2, genoma completo NC_001474.2. Para a análise das mutações de cada estrutura, foram removidas as sequências incompletas do banco de dados criado, as quais apresentaram gaps. Após isso, todas às sequências com alinhamento estável e sem irregularidades foram utilizadas na identificação, caracterização bioquímica e dos domínios referentes ao envelope. Foram consideradas mutações, os aminoácidos os quais apresentavam duas ou mais frequências nas sequências. 3.4. Modelagem estrutural da proteína E do DENV-2 A sequência aminoacídica da proteína de envelope (proteína E) do DENV-2, pertencente à linhagem Cosmopolitan, foi obtida a partir do banco de dados GISAID, sob o identificador EPI_ISL_20155579_BR_RN, correspondente a uma cepa circulante no Rio Grande do Norte. Essa sequência foi selecionada por conveniência dentre as sequências completas da proteína E de DENV-2 disponíveis para o RN no GISAID, com base em dois critérios: integridade do genoma, não apresentando lacunas ou regiões de baixa cobertura e representatividade do perfil de variação genômica de interesse, uma vez que, a partir da inspeção do alinhamento múltiplo das sequências disponíveis do RN, essa sequência apresentou o maior número de posições polimórficas compartilhadas com o restante do conjunto, sintetizando de forma mais abrangente as mutações observadas nas demais sequências presentes no banco de dados. A predição da estrutura tridimensional foi realizada por meio do AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024), utilizando-se a sequência em formato FASTA e os parâmetros padrão da plataforma. O modelo estrutural classificado em primeiro lugar foi selecionado para as análises subsequentes, considerando-se as métricas internas de confiança disponibilizadas pelo AlphaFold 3, incluindo pLDDT (predicted Local Distance Difference Test), PAE (Predicted Aligned Error) e pTM (predicted Template Modeling score). O arquivo do modelo selecionado foi exportado em formato PDB e visualizado no software UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021), utilizando-se a representação em cartoon para inspeção do enovelamento global, da continuidade da cadeia polipeptídica

e da organização dos domínios estruturais. A proteína E foi analisada considerando sua organização estrutural característica dos flavivírus em domínio I (DI), domínio II (DII), domínio III (DIII) e região stem/anchor (haste/âncora). A coloração diferencial dos domínios e o mapeamento tridimensional das substituições aminoacídicas identificadas foram realizados no ChimeraX. As posições variantes foram representadas como esferas sobre a estrutura em cartoon, permitindo avaliar sua distribuição espacial ao longo dos diferentes domínios da proteína E. 3.5. Predição de epítopos de células T A predição de epítopos de células T foi realizada utilizando ferramentas disponíveis no IEDB Analysis Resource/NG-IEDB, a partir da sequência aminoacídica da proteína E da cepa brasileira de DENV-2 pertencente à linhagem Cosmopolitan, obtida no GISAID sob o identificador EPI_ISL_20155579_BR_RN com base nos mesmos critérios de escolha da modelagem. A sequência de referência NC_001474.2, correspondente à cepa DENV-2 16681, e sua respectiva sequência da proteína E, NP_739583.2, foram utilizadas para conferência da anotação da proteína, delimitação das regiões estruturais e comparação das regiões epítopicas preditas. Para a predição de epítopos restritos ao MHC classe I, foram avaliados peptídeos de nove aminoácidos frente ao conjunto de alelos HLA classe I selecionado na plataforma. Foram empregados o NetMHCpan EL para predição da apresentação dos peptídeos pelo MHC classe I, o NetCTL para avaliação do processamento antigênico e a ferramenta Class I pMHC Immunogenicity para estimativa da imunogenicidade dos complexos peptídeo-MHC. Os candidatos foram inicialmente selecionados com base nos percentis de predição, priorizando-se os peptídeos com median binding percentile ≤ 3. Posteriormente, foram mantidos os candidatos que apresentaram valores positivos de imunogenicidade predita. Para os epítopos restritos ao MHC classe II, foram avaliados peptídeos de 15 aminoácidos utilizando o método NetMHCIIpan EL 4.1, associado à predição de imunogenicidade para células T $CD4^+$. Nessa etapa, foram priorizados os candidatos com median binding percentile ≤ 3 e menores valores de Combined Score, uma vez que valores inferiores desse parâmetro indicam maior potencial predito de imunogenicidade. Após a triagem inicial, os peptídeos selecionados para

Resultados e Discussões

4.1. Análise da situação epidemiológica dos arbovírus circulantes no Rio Grande do Norte, anos 2024, 2025 e 2026.

Os boletins analisados apresentaram dados sobre o número de casos por semana epidemiológica (SE), por sexo, faixa etária, incidência por habitantes das regiões, óbitos por município de residência e casos notificados, confirmados e coeficiente de incidência dos agravos. O boletim de 2024/RN analisa a situação epidemiológica entre as semanas 1 a 49, e mostra um aumento significativo na SE 11/2024 de aproximadamente 900% na incidência de casos prováveis em relação ao mesmo período do ano de 2023, analisado pelo Ministério da Saúde como uma tendência do período sazonal referente aos primeiros meses do ano. Após esse período houve a diminuição gradativa nos índices de infecções. Ainda em 2024 houve um aumento acima da mediana na SE 31 a 49, além de registrar uma previsão de uma nova onda de aumento de casos para o início do ano de 2025, período de sazonalidade (SESAP, 2024). Já em 2025, houve mudanças no Plano nacional de contingência dos arbovírus, enfatizando a necessidade de novos planejamentos especializados para a estratégia de vigilância em cada cenário, para a prevenção de novos surtos, publicado em 09 de janeiro, após 2024 ter sido a maior

epidemia de dengue da história do Brasil. No Rio Grande do Norte os registros publicados são referentes às SE 1 a 17, nas SE 14 e 15 houve uma maior notificação de casos em comparação ao início do ano e nas últimas 4 SE o Estado ficou abaixo mediana e acima do limite inferior do canal endêmico (frequência esperada), ficando fora do Estágio de Mobilização, que age na identificação precoce do aumento dos casos e surtos, a partir do monitoramento epidemiológico, demonstrando uma redução de cerca de 70% no número de casos prováveis comparado ao mesmo período de 2024. Nas primeiras 21 semanas do ano de 2026, a SESAP demonstrou uma diagrama que apresenta comportamento epidemiológico compatível com o esperado para o período sazonal, sem ultrapassagem da mediana histórica ou do limite superior do diagrama de controle, com o ápice de notificações ocorrendo na SE 19 (379 casos). Apesar do aumento de casos observado nas semanas mais recentes, não há indicativos de situação epidêmica, permanecendo recomendada a continuidade das ações de vigilância, prevenção e controle da doença.
Os dados disponibilizados pela secretária de saúde do RN mostram a significativa circulação do vírus DENV, denunciando a importância da compreensão do seu comportamento. A análise da possível origem do vírus DENV2 no Rio Grande do Norte pode ser inferida por meio da construção e interpretação de árvores filogenéticas e a mudanças no comportamento da sua virulência através da caracterização genética.

4.2. A análise do novo genótipo do DENV-2 circulante

A análise do novo genótipo do DENV-2 circulante no Rio Grande do Norte (RN) foi possível a partir da coleta das sequências nucleotídicas disponíveis no banco de dados Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). Os códigos de acessos das sequências são EPI ISL 20075106 e EPI ISL 20075107, coletadas no dia 13 de agosto de 2025.
As sequências EPI ISL 20075106 e EPI ISL 20075107 foram submetidas ao Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), para a coleta das 100 sequências mais similares. Foi realizada a formação do banco de sequências a partir da coleta das plataformas GISAID e NCBI, que gerou um banco de 116 sequências submetidas para o alinhamento no Mega. Dentre elas, as duas do RN e as 100 mais similares são do genótipo cosmopolita, totalizando 102 sequências cosmopolitas e 14 sequências referências dos genótipos de DENV-2.Após o alinhamento múltiplo, foi realizada a seleção do gene que codifica o Envelope viral (Gene E), que possui 1485 bp. O melhor modelo de substituição estimado para a construção da árvore filogenética indicada pelo Mega foi o Tamura-Nei (TN93+G+I) (Quadro 1). Posteriormente, foi realizada a árvore máxima verossimilhança (Figura 1). A análise da árvore filogenética permitiu estimar a origem do DENV-2 Cosmopolita circulante no Rio Grande do Norte.
Com a interpretação da árvore filogenética do DENV-2 Cosmopolitan, foi possível inferir a origem do DENV-2 Cosmopolitan circulante no Estado do Rio Grande do Norte. A reconstrução filogeográfica mostrou que o DENV-2 Cosmopolita identificado no Rio Grande do Norte foi proveniente da cidade de Limpio, Paraguay. Do Paraguai, antes de ser detectado em Tibau do Sul, no Rio Grande do Norte, o vírus circulava em São Paulo, nos municípios de Guarulhos e Piracicaba (Figura 2). Esses dados permitem conhecer melhor os locais de introdução viral e auxiliam no planejamento de ações de combate à dengue.

4.3. Identificação e caracterização bioquímica das proteínas estruturais do DENV tipo 2 cosmopolita.

Ao total, foram identificadas 30 mutações nas proteínas estruturais do vírus. As mutações presentes na proteína do envelope caracterizam metade desses resultados, demonstrando a relevância de aprofundar os estudos sobre as substituições identificadas, tendo em vista que a maioria dos anticorpos neutralizantes contra a Dengue e Flavivírus são direcionados contra a proteína E, embora alguns também possam reconhecer a proteína prM (Colombage et al. 1998) . Além disso, já foi demonstrado em outros estudos que uma única mutação na proteína do envelope modula a antigenicidade, a estabilidade e a patogenicidade de Flavivírus, com bases moleculares e consequências funcionais pouco compreendidas (Leslie Goo et al. 2017).
As mutações mais persistentes foram identificadas no na proteína C, com as substituições T31M e M87I presentes em quase todas as sequências do banco de dados. Essas mutações podem em Flavivírus indicar mudanças no comportamento da replicação viral, devido a principal função do capsídeo ser a montagem de partículas virais por meio da interação com o genoma de RNA viral e a membrana do retículo endoplasmático, no DENV essas mutações podem afetar a oligomerização do capsídeo, reduzindo a produção de partículas infecciosas, prejudicando a entrada celular (Sangiambut et al., 2021 e Jablunovsky et al., 2024).
Em um estudo sobre o Zika vírus de Jablunovsky, eles identificaram evidências também com o DENV, que apontam interações entre a proteína C e prM. Onde essas proteínas interagem geneticamente entre si, provocando mutações compensatórias durante o seu processo de maturação para a replicação. Evidenciando, talvez, a razão pela qual o número de mutações dos capsídeos e do precursor de membrana identificados no nosso estudo serem semelhantes.
Na proteína E foram identificadas 4 mutações não sinônimas, e 3 mudaram suas características apolares para polares, essa mutação possui influência na mudança do pH da proteína E, tornando ela mais ácida. Podendo influenciar na virulência do DENV2, devido a proteína E ser caracterizada por facilitar a fusão do vírus com as membranas endossômicas dos hospedeiros.
No geral, nenhuma das 15 mutações identificadas já foram descritas, apenas algumas registradas na mesma posição. Foi identificada no estudo de Siritorn Butrapet et al. uma substituição Q52R na proteína E, caracterizada por apresentar uma redução na estabilidade da região da dobradiça ou haste. A replicação viral apresentada no estudo era inicialmente rápida e semelhante ao vírus selvagem, porém logo houve um efeito citopático acentuado (ECP) em células Vero. Essa pressão seletiva identificada na posição 52 apresentou o desencadeamento de mutações compensatórias e adaptativas, K122I e L277S, localizadas no DII e dobradiça, as quais antes apresentavam instabilidade. Com essas novas características adaptativas o vírus passou a exigir um pH um pouco mais básico no limiar de fusão de membrana (6,5 e 6,8).
A proteína E é o principal alvo para a formação de anticorpos neutralizantes diante da sua função na endocitose e fusão mediada por receptores das células hospedeiras. Com o mapeamento das substituições dos aminoácidos que constituem o envelope, é possível mapear também em qual domínio foi identificado a mutação e a sua importância. Foram identificadas 5 mutações no Domínios I e 5 mutações no Domínio II. Substituições nesses domínios afetam a infectividade e o limiar de pH para fusão (Butrapet et al. 2011). No Domínio III foram identificadas 2 substituições, nesse domínio as mutações estão relacionadas com a ligação dos receptores celulares e capacidade replicativa do vírus (Guan et al. 2020).

4.4. Modelagem estrutural e análise molecular

A predição estrutural da proteína E do DENV-2 pelo AlphaFold 3 gerou um modelo

principal com pTM de 0,75, indicando consistência global satisfatória da estrutura predita para as análises propostas. A avaliação dos valores de pLDDT demonstrou predominância de regiões com níveis elevados de confiança local, embora tenham sido observados trechos pontuais com menor confiança predita. A modelagem estrutural da proteína do Envelope permitiu visualizar a distribuição espacial das mutações identificadas nas sequências analisadas. A Figura 2 apresenta a organização das substituições identificadas da referência base do DENV 2 em relação à sequência mais recente circulante no Estado do RN em 2025.
Essa abordagem permitiu identificar a localização espacial das mutações nos três domínios estruturais do da proteína E, evidenciando sua distribuição em regiões de superfície possibilitando, assim, contextualizar as substituições na perspectiva estrutural das proteínas e integrar os achados genéticos aos modelos estruturais obtidos.

4.5. Predição de epítopos de células T CD8+ restritos ao MHC classe I

A predição de epítopos restritos ao MHC classe I resultou na identificação de 100 peptídeos únicos na sequência analisada e 101 peptídeos únicos na sequência de referência (RefSeq). A comparação direta entre os dois conjuntos demonstrou que 81 peptídeos apresentaram sequências aminoacídicas idênticas, correspondendo a 81,0% dos peptídeos identificados na sequência analisada e a 80,2% daqueles identificados na RefSeq.
Consequentemente, 19 peptídeos da sequência analisada e 20 peptídeos da RefSeq não apresentaram correspondência idêntica entre os dois conjuntos. Entre esses peptídeos não idênticos, foram identificados 15 pares de nonâmeros (peptídeos de 9 aminoácidos) correspondentes que diferiram entre si por uma única substituição de aminoácido.
Quanto à antigenicidade predita pelo VaxiJen, considerando o ponto de corte de 0,4, 69 dos 100 peptídeos (69,0%) da sequência analisada foram classificados como antigênicos, enquanto 69 dos 101 peptídeos (68,3%) da RefSeq apresentaram essa classificação. Os demais 31 peptídeos (31,0%) da sequência analisada e 32 peptídeos (31,7%) da RefSeq foram classificados como não antigênicos, conforme descrito na Tabela 4.

4.5.1. Variações nas sequências peptídicas e antigenicidade

Entre os peptídeos que não apresentaram sequência idêntica nos dois conjuntos, foram reconhecidos 15 pares correspondentes de nonâmeros diferenciados por uma única substituição de aminoácido. Embora essas substituições tenham provocado alterações quantitativas nos escores de antigenicidade, nenhum dos 15 pares apresentou mudança na classificação qualitativa de antigenicidade pelo VaxiJen.
Dos 15 pares avaliados, nove permaneceram classificados como antigênicos em ambas as sequências, enquanto seis permaneceram classificados como não antigênicos. Para a comparação detalhada, foram considerados os nove pares que atenderam ao ponto de corte de antigenicidade adotado, conforme apresentado na Tabela 5.
A elevada proporção de peptídeos compartilhados entre a sequência analisada e a RefSeq sugere considerável conservação do repertório predito para MHC classe I. Apesar da presença de substituições aminoacídicas, nenhuma resultou em mudança da classificação de antigenicidade pelo VaxiJen, embora tenham sido observadas variações quantitativas nos escores preditos. Esse padrão sugere que, segundo os critérios empregados, as substituições identificadas não foram suficientes para alterar a classificação antigênica dos peptídeos correspondentes. A coexistência de regiões

conservadas e variáveis na proteína E também foi observada por da Silva et al. (2026), que identificaram epítopos de células T CD8+ conservados entre sequências de DENV, alguns dos quais mantiveram a classificação de antigenicidade apesar de variações aminoacídicas.

4.6. Predição de epítopos de células T CD4+ restritos ao MHC classe II

A predição de epítopos restritos ao MHC classe II resultou na identificação de 10 peptídeos únicos na sequência analisada e 2 peptídeos únicos na sequência de referência (RefSeq). A comparação direta entre os dois conjuntos demonstrou que os dois peptídeos identificados na RefSeq também estavam presentes de forma idêntica na sequência analisada, correspondendo a 20,0% dos peptídeos identificados na sequência analisada e a 100% daqueles identificados na RefSeq.

Quanto à antigenicidade predita pelo VaxiJen, considerando o ponto de corte de 0,4, seis dos 10 peptídeos (60,0%) da sequência analisada foram classificados como antigênicos, enquanto os dois peptídeos da RefSeq (100%) apresentaram essa classificação. Os demais quatro peptídeos (40,0%) da sequência analisada foram classificados como não antigênicos, conforme a Tabela 6.

4.6.1. Antigenicidade dos peptídeos preditos.

Após a aplicação do ponto de corte de antigenicidade do VaxiJen, seis peptídeos da sequência analisada permaneceram como candidatos antigênicos. Os maiores escores de antigenicidade foram observados para LDFELIKTEAKHPAT (1,0270), PPFGDSYIIIGVEPG (0,8837), QHGTIVIRVQYEGDG (0,8539) e LITVNPIVTEKDSPV (0,7511). Como pode-se observar na Tabela 7.

4.5.2. Conservação dos peptídeos identificados na RefSeq

Os dois peptídeos identificados na RefSeq, WIQKETLVTFKNPHA e TLVTFKNPHAKKQDV, também foram identificados de forma idêntica na sequência analisada e mantiveram a classificação como antigênicos pelo VaxiJen, com escores de 0,4213 e 0,5200, respectivamente. Além desses peptídeos compartilhados, oito sequências adicionais foram preditas na sequência analisada do RN, das quais quatro foram classificadas como antigênicas. Essa diferença evidência variação no repertório de candidatos preditos para MHC classe II entre as duas sequências, embora a natureza in silico da análise não permita caracterizá-los como novos epítopos funcionais. A utilização de abordagens computacionais para a seleção de candidatos de células T no DENV é sustentada por Sánchez-Burgos et al. (2010), que selecionaram peptídeos por métodos bioinformáticos e avaliaram experimentalmente sua imunogenicidade. Assim, os seis peptídeos antigênicos identificados no presente estudo constituem candidatos para posterior validação experimental.

4.7. Predição de epítopos lineares de células B

A predição de epítopos lineares de células B resultou na identificação de oito segmentos peptídicos de 6–25 aminoácidos na RefSeq e seis na sequência analisada. Entre eles, dois segmentos apresentaram sequências idênticas, três pares corresponderam a regiões diferenciadas por uma única substituição aminoacídica e uma região correspondente apresentou alteração na extensão predita pelo BepiPred-2.0.

Considerando o ponto de corte de 0,4 no VaxiJen, quatro dos seis segmentos (66,7%) da sequência analisada e quatro dos oito (50,0%) da RefSeq foram classificados como antigênicos. Assim como descrito na Tabela 8.

4.7.1. Conservação e variação dos segmentos peptídicos.

Entre os segmentos classificados como antigênicos, WDFGSLGG foi integralmente conservado entre a RefSeq e a sequência analisada, apresentando escore VaxiJen de 2,1175 em ambas as sequências.

Dois pares de segmentos antigênicos apresentaram uma única substituição aminoacídica. O par FLDLPLPWLPGADTQGSNWIQKE/FLDLPLPWLPGADIQGSNWIQKE apresentou escores de 0,4451 e 0,4664 para a RefSeq e a sequência analisada, respectivamente. O par QLKLNWFKKGSS/QLKLSWFKKGSS também permaneceu classificado como antigênico, com aumento do escore de 0,6801 para 0,8835. Como pode-se observar na Tabela 9.

A maior variação entre os pares diferenciados por uma única substituição foi observada para QLKLNWFKKGSS/QLKLSWFKKGSS, cujo escore aumentou em 0,2034 na sequência analisada. Apesar das diferenças observadas, os dois pares permaneceram classificados como antigênicos.

Também foi observada alteração na delimitação de uma região predita pelo BepiPred-2.0. Na RefSeq, o segmento CKIPFEIMDLEKRH, com 14 aminoácidos, apresentou escore de antigenicidade de 1,3131. Na sequência analisada, a região parcialmente correspondente foi delimitada como FEIMDLECH, com nove aminoácidos e escore de 1,8230. Apesar da diferença no comprimento e nos limites das regiões preditas, ambas foram classificadas como antigênicas.

De maneira geral, quatro segmentos foram classificados como antigênicos em cada sequência. Entre os candidatos diretamente comparáveis, as diferenças de sequência e de delimitação alteraram quantitativamente os escores de antigenicidade, mas não modificaram a classificação qualitativa pelo VaxiJen. Esses resultados sugerem relativa conservação do potencial antigênico predito da proteína E, embora variações aminoacídicas possam influenciar o reconhecimento por anticorpos (Alam et al., 2026).

Conclusão

A reconstrução filogeográfica mostrou que o DENV-2 Cosmopolita identificado no Rio Grande do Norte foi proveniente da cidade de Limpio, Paraguai. Do Paraguai, antes de ser detectado em Tibau do Sul (RN), o vírus foi identificado nos municípios de Guarulhos (SP) e Piracicaba (SP). Esses dados permitem conhecer melhor os locais de introdução viral e auxiliam no planejamento de ações de combate à dengue. Com a identificação e caracterização das proteínas estruturais do DENV-2, foram identificadas 30 mutações: 15 no Envelope, 7 no Capsídio e 8 no Precursor de Membrana. Essas substituições, quando associadas a características bioquímicas, podem indicar mudanças no comportamento do vírus no sistema imunológico em relação a virulência e replicabilidade. As análises in silico sugerem que a sequência de DENV-2 circulante no Rio Grande do Norte apresenta conservação relevante do potencial antigênico predito da proteína E em relação à RefSeq, especialmente para MHC classe I, embora tenham sido observadas diferenças pontuais no repertório de candidatos para MHC classe II e células B. Esses achados representam predições computacionais e requerem validação experimental.

Referências

ABRAMSON, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature, v. 630, p. 493–500, 2024. ALAM, Shaheen et al. Epitope dynamics and antigenic shifts in dengue virus serotype 2 cosmopolitan genotype with structural changes in Bangladesh from 2017 to 2023. Scientific Reports, v. 16, n. 1, p. 11428, 2026. BUTRAPET, Siritorn et al. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. Virology, v. 413, n. 1, p. 118-127, 2011. BRESSANELLI, Stéphane et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. The EMBO journal, v. 23, n. 4, p. 728, 2004. COLOMBAGE, G. et al. DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. Virology, v. 250, n. 1, p. 151-163, 1998. DA SILVA, Maria Karolaynne et al. Computational identification of conserved dengue virus envelope protein epitopes for vaccine design and immunodiagnostic platform. Scientific Reports, 2026. DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics, v. 8, art. 4, 2007. GOO, Leslie et al. A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. PLoS pathogens , v. 13, n. 2, p. e1006178, 2017. GUAN, Jiaoqiong et al. Molecular characterization of the viral structural protein genes in the first outbreak of dengue virus type 2 in Hunan Province, inland China in 2018. BMC Infectious Diseases, v. 21, n. 1, p. 166, 2021. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791. JABLUNOVSKY, Anastazia; NARAYANAN, Anoop; JOSE, Joyce. Identification of a critical role for ZIKV capsid α3 in virus assembly and its genetic interaction with M protein. PLoS neglected tropical diseases, v. 18, n. 1, p. e0011873, 2024. JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. Nucleic Acids Research, v. 45, n. W1, p. W24–W29, 2017. Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S., and Tamura K. (2024). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 12 for adaptive and green computing. Molecular Biology and Evolution 41:1-9. Ministério da Saúde. Manual - Plano de contingência nacional para dengue, chikungunya e Zika (2025). Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/guias-e-manuais/2025/plano-de-contingencia-nacional-para-dengue-chikungunya-e-zika.pdf/view Acesso em: 27 de agosto de 2025. PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Protein Science, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021. SÁNCHEZ-BURGOS, Gilma et al. Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. Virus research, v. 153, n. 1, p. 113-120, 2010. Samir Bhatt, Gething W, Brady J, at al. The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013 Apr 25;496(7446):504-7. SÁNCHEZ-BURGOS, Gilma et al. Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. Virus research, v. 153, n. 1, p. 113-120, 2010. Secretaria de Estado da Saúde Pública (SESAP-RN). Boletim epidemiológico das Arboviroses, dados referentes à Semana Epidemiológica 1 a 17, Nº 012/2025. Disponível em: http://www.adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC000000000352707.PDF Acesso em: 26 de agosto de 2025. Secretaria de Estado da Saúde Pública (SESAP-RN). Boletim epidemiológico das Arboviroses, dados referentes à Semana Epidemiológica 1 a 49, Nº 6/2024. Disponível em: http://www.adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC000000000345112.PDF

Acesso em: 26 de agosto de 2025. Secretaria de Estado da Saúde Pública (SESAP-RN). Boletim epidemiológico das Arboviroses, dados referentes à Semana Epidemiológica 1 a 21, Nº 16/2026. Disponível em: http://www.adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC000000000370499.PDF Acesso em: 23 de agosto de 2026. SANGIAMBUT, Sutha et al. Increased capsid oligomerization is deleterious to dengue virus particle production. Journal of General Virology, v. 102, n. 8, p. 001635, 2021. SILVA, Maria Karolaynne da. Desenvolvimento de uma vacina de subunidade multi-epítopo contra um arbovírus negligenciado das Américas: uma abordagem por imunoinformática e modelagem molecular. 2023. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023. Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10:512-526. The globally expanding dengue problem. London: Royal Society of Tropical Medicines and Hygiene, 2019. Disponível em: https://www.rstmh.org/news-blog/blog/the-globally-expanding-dengue-problem Acesso em: 26 de agosto de 2025. Ujwal S, Sabeena S , Bhaskar R, et al. Circulation of Asian-I and Cosmopolitan genotypes of Dengue-2 virus in northeast India, 2016-2017. J Vector Borne Dis. 2019. Jul-Sep;56(3):231-236. VITA, R. et al. The Immune Epitope Database (IEDB): 2024 update. Nucleic Acids Research, v. 53, n. D1, p. D436–D443, 2025. World Health Organization. Dengue. 2025. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue Acesso em: 26 de agosto de 2025.

Anexos



Tabela 1



tabela 2



legenda tabela 2.



tabela 3



figura 2



tabela 4



tabela 5



tabela 6



tabela 7



tabela 8



tabela 9



quadro 1



figura 2



figura 1

CÓDIGO: SB1081

AUTOR: GIOVANNA CAMARA PICANCO SANTIAGO

ORIENTADOR: KATIA CASTANHO SCORTECCI

TÍTULO: Efeito do estresse hídrico combinado com microgravidade simulada em plantas de Lemna aequinoctialis

Resumo

A aplicação combinada de estresses em plantas tem sido amplamente explorada para compreender e melhorar a produção de compostos bioativos. O estudo da microgravidade simulada está associado à exploração espacial, enquanto o estresse hídrico ganha relevância diante das mudanças climáticas. Lemna aequinoctialis, pertencente à família Lemnoideae, desperta grande interesse econômico devido ao seu elevado teor proteico. Este trabalho investigou os efeitos da combinação entre microgravidade simulada, obtida por clinostato 2D em rotação de 15 e 45 rpm, e estresse hídrico, induzido por PEG 6000 a 15%. As plantas foram submetidas aos estresses combinados por 2 horas, e comparadas com controles submetidos a estresses isolados e sem estresse. As análises foram realizadas em três momentos (0, 5 e 10 dias) e incluíram dosagem de proteínas totais, quantificação de compostos fenólicos, atividade antioxidante de DPPH e poder redutor e medição dos pigmentos fotossintéticos. A microgravidade simulada em clinostato 2D e o estresse osmótico por PEG 6000 provocaram respostas bioquímicas antagônicas na planta de Lemna aequinoctialis, onde houve um aumento do teor proteico sob alteração gravitacional em contraste com a redução proteica, acúmulo de compostos fenólicos e elevação da capacidade antioxidante sob estresse hídrico. Assim, este estudo tem contribuído para a compreensão dos efeitos da combinação de estresses no metabolismo de L. aequinoctialis.

Palavras-chave: microgravidade; clinostato; lemna; PEG 6000.

TITLE: Effect of combined water stress and simulated microgravity on Lemna aequinoctialis plants

Abstract

The combined application of stresses in plants has been widely explored to understand and improve the production of bioactive compounds. The study of simulated microgravity is associated with space exploration, while water stress has gained increasing relevance in the context of climate change. Lemna aequinoctialis, belonging to the Lemnoideae subfamily, has attracted considerable economic interest due to its

high protein content. This study investigated the effects of combining simulated microgravity, obtained using a 2D clinostat rotating at 15 and 45 rpm, with water stress induced by 15% PEG 6000. The plants were subjected to the combined stresses for 2 hours and compared with controls exposed to isolated stresses and stress-free conditions. Analyses were performed at three time points (0, 5, and 10 days) and included the determination of total protein content, quantification of phenolic compounds, antioxidant activity using DPPH and reducing power assays, and measurement of photosynthetic pigments. Simulated microgravity using a 2D clinostat and osmotic stress induced by PEG 6000 elicited biochemical responses in Lemna aequinoctialis, with an increase in protein content under altered gravitational conditions, in contrast to the reduction in protein content, accumulation of phenolic compounds, and increased antioxidant capacity observed under drought stress. Thus, this study contributes to a better understanding of the effects of combined stresses on metabolism of lemna.

Keywords: microgravity; clinostat; lemna; PEG 6000

Introdução

Há bastante tempo cientistas pesquisam as plantas e seu uso medicinal para ampliar o conhecimento e então direcionar sua aplicação em tratamentos diversos de forma mais eficaz. Por intermédio de diversas estratégias, são realizados estímulos ou estresses abióticos nas plantas no intuito de melhorar e/ou compreender a produção de compostos bioativos presentes nelas, como por exemplo os metabólitos secundários, os quais podem ser isolados para sua utilização na indústria de medicamentos, cosméticos e alimentos (Isah, 2019). Dessa maneira, compreende-se que os resultados obtidos após utilização desses fatores abióticos podem ser potencializados quando atuam dois ou mais fatores em conjunto (Galon, 2010).

Desde a década de 70, existe um interesse em conhecer como as plantas respondem sob efeito da gravidade 0 g, após surgirem preocupações se o homem conseguiria viver em outro planeta. Com os avanços dos estudos, foi visto que a aplicação da gravidade em plantas também pode influenciar seu desenvolvimento e na produção dos metabolismos secundários (Santos, 2022). Por conseguinte, foi-se necessário encontrar meios alternativos para simular a aplicação da microgravidade nas plantas, visto que nem sempre é possível submeter as plantas a condições reais de microgravidade, assim, a utilização de um aparelho chamado clinostato seria a forma mais efetiva para isso.

O estresse hídrico ocorre quando a quantidade de água disponível é insuficiente para ser absorvida pela planta., e visto que a água é uma unidade essencial na vida das plantas, sua escassez pode causar diversos prejuízos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos a elas (Araújo et al., 2010). Assim, para simulação do déficit hídrico pode ser utilizado o polietileno glicol (PEG 6000), uma vez que, ao possuir um alto peso molecular, tem a capacidade de sequestrar as moléculas de água presentes no solo ou em meio de cultura além de não penetrar nas células vegetais, e não ser toxico para as plantas (Plaut, 1985).

Deste modo, neste trabalho o alvo para os estudos combinando os estresses de microgravidade, por meio de um clinostato 2D, e o hídrico, por meio de PEG 6000, são as plantas aquáticas Lemna aequinoctialis, pertencentes a subfamília Lemnoideae. Estas

são conhecidas por serem as menores angiospermas e por possuírem um rápido ciclo de vida, podendo dobrar sua biomassa em 2 dias (Wang & Messing, 2011). Por esses motivos, são plantas de fácil cultivo em condições de laboratório, facilitando assim, os estudos e aplicações destes dois estresses sobre elas.

Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar como a combinação dos estresses, abióticos da microgravidade simulada e do déficit hídrico promovido pelo PEG 6000, e como este afeta as plantas de Lemna aequinoctialis.

Metodologia

As plantas de L. aequinoctialis foram crescidas em uma sala de cultivo, com uma temperatura de 22-24 C° em fotoperíodo de 12h, no Laboratório de Transformações de Plantas e Análise em Microscopia (LTPAM). As plantas foram cultivadas em potes de vidros de 100 mL, previamente autoclavados, com 25 mL de meio 0,5 X SH com 1% de sacarose (Schenk & Hildebrandt, 1972). As plantas foram repicadas a cada 15 dias, sendo colocadas em um novo pote com a mesma quantidade de meio de cultivo, renovando-o.

Para submeter as plantas de L. aequinoctialis às condições de microgravidade e de estresse hídrico ao mesmo tempo, as plantas foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL com 7 mL de meio de cultivo 0,5 X SH com 1% de sacarose e com uma concentração de 15% de PEG 6000 de acordo com a tabela de Villela (1991). Em seguida, as plantas foram submetidas à rotação de 15 e 45 RPM no aparelho de clinostato 2D por um período de 2 horas. Decorrido este tempo de tratamento, as plantas foram transferidas para novos potes de vidro contendo o meio de cultura como descrito acima, e colocadas na sala de crescimento para continuarem a se desenvolver durante 5 e 10 dias.

Para este experimento foram utilizados três tipos de controles diferentes: o primeiro onde as plantas não passaram por nenhum tipo de estresse, o segundo onde as plantas foram submetidas ao tratamento com clinostato 2D em meio de cultivo SH e o terceiro controle onde as plantas foram somente submetidas ao estresse hídrico com meio de cultivo SH com 15% de PEG 6000. Dessa maneira, o controle submetido à microgravidade foi feito simultaneamente com o experimento da combinação de estresses, visto que cabem 6 tubos cônicos de 15 mL por vez no clinostato. Cada ensaio foi realizado em triplicata (utilizando 3 tubos). Os controles que não passaram pelo clinostato 2D durante o tempo de experimento, ficaram em tubos cônicos repousando na bancada. Após o término tempo, eles foram colocados em novos potes de vidro de 100 mL.

Depois que as plantas foram transferidas para os novos potes, estas foram avaliadas em 0, 5 e 10 dias. Após o tratamento do clinostato 2D e do PEG 6000, as amostras do experimento e dos grupos controles de 0 dias já foram separadas para seguir o procedimento de obtenção dos extratos aquosos. O dos grupos de 5 e 10 dias, foram avaliados apenas após este período.

Obtenção dos extratos

Para a obtenção do extrato aquoso, as plantas de L. aequinoctialis foram removidas cuidadosamente dos potes de vidro e colocadas em papel folha para retirar o excesso de meio de cultura. Após secas, elas foram pesadas e trituradas com água destilada em grau e pistilo na proporção de 10 mL de água destilada para cada 0,1 g de planta. Depois de serem trituradas, o material foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e foram agitados por 24 horas em uma mesa agitadora (TECNAL, SP) a uma velocidade de 125 rpm. Decorrida as 24 horas, o material foi filtrado com papel filtro e transferidos para placas de Petri, as quais foram colocadas na estufa a 60 °C por 48 horas para secar.

Depois do extrato totalmente seco, o material foi removido das placas de Petri com o auxílio de uma espátula e transferido para tubos cônicos de 1,5 mL. Novamente pesou-se e adicionou-se água para obter um extrato com concentração estoque de 10 mg/mL, ou seja, foi adicionada 1 mL de água destilada para cada 100 mg de material. Em seguida, os tubos cônicos foram agitados com um vórtex e armazenados em um freezer –20 °C até o momento de uso nos ensaios bioquímicos.

Testes bioquímicos, antioxidante e pigmentos fotossintéticos

Com os extratos das L. aequinoctialis prontos, dois testes bioquímicos foram realizados a fim de medir a quantidade de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteau, a quantidade de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Dois testes antioxidantes também foram realizados, um de iniciação, o Poder redutor conforme descrito por Oyaizu (1986), e um de terminação, o DPPH, pelo método de Shimada et al., (1992). Além desses testes, pigmentos fotossintéticos como clorofila A, clorofila B e carotenoides também foram medidos pelo método de Wellburn (1994).

Todos os testes foram analisados em espectrofotômetro (Biotek Epoch Microplate, California, USA) presente no Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) no departamento de Bioquímica (DBQ) da UFRN, sob a coordenação do prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha.

As análises estatísticas foram feitas através do programa Graphpad Prism 10.5.0 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA) e o teste de Tukey foi realizado para comparação das diferenças entre os extratos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

1. Compostos Fenólicos

A dosagem dos compostos fenólicos, os principais e mais abundantes metabólitos secundários nas plantas, para 2 horas 15 RPM (Figura 1) pode ser visto um aumento significativo nas variações com PEG (CPEG e C+PEG) nos três dias de análise, em destaque para CPEG no dia 10. Para 2 horas 45 RPM (Figura 1) segue o mesmo padrão

de aumento dos compostos fenólicos, onde as variações com PEG apresentaram também um aumento significativo, com destaque novamente para o dia 10, onde CPEG e C+PEG tiveram o maior aumento em relação ao controle negativo.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários mais abundantes presentes nas plantas (Edo, 2025). Eles são caracterizados como um mecanismo de defesa antioxidante para prevenir danos e destruições de tecidos e membrana celular e seu aumento de produção pode causar inibição do crescimento celular (Albergaria, 2020). Estudos revelam que uma reação comum nas plantas que sofrem déficit de água é o aumento dos compostos fenólicos (Sánchez-Rodríguez, 2011). Assim, nesse trabalho foi visto que as variações que foram induzidas ao estresse hídrico (CPEG) e a ambos aos estresses (C+PEG) tiveram um aumento dos compostos fenólicos em relação aos controles negativos, corroborando com resultados previamente vistos em outras espécies de plantas.

Por outro lado, a microgravidade (15 RPM) e a gravidade parcial moderada (45 RPM) não surtiram efeitos nas amostras, sugerindo que a alteração do vetor gravitacional, isoladamente, não é suficiente para induzir mudanças nos compostos fenólicos na L. aequinoctialis.

2. Dosagem Total de Proteínas

Para dosagem de proteínas totais, em 2 horas 15 RPM (Figura 2), os extratos com estresse hídrico tiveram uma diminuição significativa nos três dias de análise, já o controle com estresse do clinostato teve um aumento significativo nos dias 0 e 5. Para 2 horas 45 RPM (Figura 2), as variações de combinação de estresse C+PEG tiveram uma diminuição significativa nos três dias de análise. Já o controle clinostato (CC) teve aumento significativo nos dias 0 e 5.

A espécie L. aequinoctialis é reconhecida pelo seu alto valor proteico, servindo como um substituto mais sustentável na alimentação de diversos animais, como gado e peixes (Baek, 2021). O aumento significativo no teor de proteínas analisados nesse trabalho ocorreu majoritariamente nas lemnas que passaram sob o estresse da microgravidade simulada e gravidade parcialmente moderada no clinostato. Esse acúmulo proteico devido a microgravidade simulada e gravidade parcial moderada é um bom indicativo que as alterações no vetor gravitacional são percebidas como um estímulo estressante (Nie, 2025). Por outro lado, quando a lemna é submetida ao estresse hídrico, ela inicia uma regulação osmótica e essa regulação pode minimizar os processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos na planta para tentar evitar ao máximo de perder suas funções fotossintéticas (Yang, 2021). Assim como pode ser visto nos testes de dosagem de proteínas total realizados, os quais o PEG 6000 promoveu uma diminuição no teor de proteínas nas lemnas.

3. DPPH

O ensaio de DPPH avalia a capacidade antioxidante dos extratos por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio ao radical DPPH, promovendo a sua redução. Dessa maneira, na Figura 3, pode ser visto que os extratos de Lemna aequinoctialis

demonstraram capacidade de sequestro do radical de DPPH, porém, ao comparar os diferentes tratamentos e condições, não foram observadas variações significativas entre eles, mantendo um perfil de atividade redutora igual em grande parte das variações de estresses e concentrações testadas.

O estresse abiótico submete a planta a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais têm efeito direto e indireto na síntese de antioxidantes e na regulação de metabolismo secundário (Albergaria, 2020). Assim, nesse trabalho foi realizado dois tipos de testes para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de L. aequinoctialis. O ensaio de sequestro de radicais de DPPH foi realizado a fim de analisar a atividade antioxidante no estágio de terminação. Estudos mostram que os Compostos Fenólicos podem aumentar atividades antioxidantes contra os radicais de DPPH (Yadav, 2024). Essa relação direta dos compostos fenólicos foi vista no poder redutor e pode ser vista nas concentrações 50 µg/mL e 250 µg/mL, onde as melhores atividades de captura de DPPH foram nas alíquotas com presença do PEG 6000.

4. Poder redutor

O teste de poder redutor, que doa elétrons, foi realizado para analisar o estágio de iniciação do estresse oxidativo, e que, da mesma forma que as lemnas submetidas ao estresse hídrico apresentaram aumento nos compostos fenólicos, as plantas de L. aequinoctialis também exibiram maior atividade redutora quando submetidas ao tratamento com PEG 6000, reforçando essa estreita relação entre o metabolismo secundário e a resposta antioxidante. Também pode ser visto que o clinostato não foi tão eficaz com mudanças expressivas na atividade redutora, o que também se correlaciona diretamente aos resultados vistos nos compostos fenólicos.

Assim, pode-se observar que em 2 horas 15 RPM 0 dias (Figura 4) não houve nenhuma diferença significativa, já em 5 dias, as variações CPEG e C+PEG apresentaram melhores atividades redutoras em comparação ao controle, dando destaque para C+PEG. Para 2 horas 15 RPM 10 dias, CPEG apresentou aumento significativo. Já em 2 horas 45 RPM (Figura 4), pode-se observar que no dia 0 também não houve diferenças significativas, em 5 dias CPEG diminuiu sua atividade redutora. Por fim, em 10 dias o extrato que melhor teve atividade redutora foi o controle com PEG 6000 (CPEG).

5. Pigmentos Fotossintéticos

A clorofila é um pigmento natural e está presente desde seres procariotos fotossintéticos até as plantas angiospermas (Yang, 2025). Os pigmentos de clorofila consistem em dois grupos principais, clorofila A e clorofila B (Sonobe, 2020). Os carotenoides também atuam como fotorreceptores e ajudam na captação da luz para a fotossíntese (Sonobe, 2020).

Dessa forma, para os pigmentos fotossintéticos foram medidos clorofila A, clorofila B e carotenoides. Em 2 horas 15 RPM (Figura 5), a clorofila A em CSN e CC tiveram um aumento no quinto dia de análise, mas no decimo dia a variação sem estresse (CSN) diminui a um ponto que não teve diferença significativa com o dia 0 e o controle clinostato (CC) teve uma diminuição significativa em relação ao dia 0. Já as lemnas que foram submetidas ao PEG 6000 (CPEG e C+PEG) tiveram o efeito contrário, no quinto dia de análise o conteúdo da clorofila A diminuiu em relação ao dia 0, mas voltaram a

aumentar no dia 10 de análise, igualando-se aos valores iniciais. Na clorofila B no controle sem estresse (CSN) o padrão se repete igual a clorofila A, onde o quinto dia teve um aumento do seu conteúdo, mas no dia 10 de análise o conteúdo volta a diminuir até não ter diferença significativa com o dia 0). Para a amostra que é submetida a microgravidade (CC) o mesmo também acontece, o dia 5 de análise tem um aumento significativo, mas no décimo dia há uma queda no conteúdo da clorofila B. Já nos tratamentos CPEG e C+PEG, observou-se uma redução contínua do conteúdo de clorofila B, que diminuiu no dia 5 de análise e apresentou queda ainda mais acentuada no décimo dia. Para carotenoides, CSN apresentou um aumento significativo no dia 5. Em CC, o decimo dia teve uma diminuição significativa. Em CPEG e C+PEG o padrão de comportamento foi igual, onde os dias tiveram um aumento significativo crescente do conteúdo de carotenoides.

Na condição de 2 horas e 45 RPM (Figura 6), a clorofila A em CSN teve um aumento significativo no quinto dia, já no decimo dia, o conteúdo do pigmento fotossintético teve uma redução significativa comparada ao dia 0 de análise. Em CC, o dia 5 também teve um aumento seguido de uma diminuição significativa no dia 10. Para CPEG e C+PEG, ambos tiveram seus conteúdos de clorofila A reduzidos no dia 5, seguidos de um aumento em comparação ao dia 0 no décimo dia de análise. Para a clorofila B, CSN e CC apresentaram um aumento significativo no dia 5 e uma diminuição no dia 10. CPEG em 5 dias teve uma redução no conteúdo da clorofila B, seguido de uma redução maior no décimo dia. C+PEG teve uma redução significativa apenas no dia 10 de análise. Em carotenoides, CSN no dia 5 apresentou um aumento significativo no dia 5 e uma diminuição significativa no dia 10. Em CC nenhum dia de análise apresentou níveis conteúdos de carotenoides diferentes do dia 0. Nas lemnas submetidas ao estresse hídrico (CPEG e C+PEG), o quinto dia de análise apresentou diminuições significativas, mas no dia 10, ambos níveis de conteúdo de carotenoides tiveram aumentos significativos em relação ao dia 0.

A gravidade é um fator essencial na produção de fotossíntese, e a sua alteração influência seu nível em várias plantas (Jaktap, 2011). Em um experimento em sementes de arroz, realizados por Jaktap 2011, mostrou que a microgravidade teve um efeito de aumento dos pigmentos fotossintéticos nos dias 3, 5 e 7 de análise, entretanto, após o sétimo dia, esses níveis tiveram redução. Tais resultados são condizentes com o presente trabalho realizado em plantas de L. aequinoctialis, onde a aplicação da microgravidade e gravidade parcial moderada (15 RPM e 45 RPM respectivamente) apresentaram aumentos no dia 5 de análise, mas no dia 10, os níveis de pigmentos fotossintéticos tiveram redução em relação ao dia 0. Essa redução pode se dar devido a senescência, que é o envelhecimento celular, uma vez que a Lemna é uma planta com rápido crescimento, podendo dobrar sua massa em 3 dias (Pasos-Panqueva, 2024).

O estresse hídrico também afeta os pigmentos fotossintéticos, reduzindo a taxa fotossintética das plantas (Yan, 2024). As lemnas submetidas ao PEG 6000, apresentaram um padrão de diminuição dos níveis dos pigmentos fotossintéticos no quinto dia de análise. Porém, no decimo dia de análise, plantas submetidas ao estresse hídrico tenderam a aumentar seus níveis de pigmentos fotossintéticos, níveis até maiores que o dia 0 de análise. Tais resultados sugerem que após os 5 dias em estresse hídrico, a lemna entra em processo de recuperação dos danos causados pela regulação osmótica devido ao estresse da seca.

Conclusão

Conclui-se que a alteração da gravidade em clinostato 2D e o estresse hídrico induzido por PEG 6000 provoca respostas fisiológicas e bioquímicas quase antagônicas nas plantas de L. aequinoctialis, evidenciando um reajuste metabólico adaptativo para cada condição de estresse. Enquanto a microgravidade promoveu uma reação metabólica de aumento do teor proteico nas plantas, o estresse hídrico mostrou uma adaptação metabólica das vias de defesa e osmorregulação, causando diminuição no teor proteico e aumento dos metabólitos secundários. Assim, os compostos fenólicos no estresse hídrico tiveram um aumento devido aos processos de osmose que a planta entra quando expostas ao PEG 6000, e consequentemente, esse aumento influencia maiores níveis de atividade antioxidante vistas nesse trabalho. Os pigmentos fotossintetizantes também se comportaram diferente nos dois tipos de estresse, enquanto a microgravidade tendeu a oferecer um aumento no quinto dia e uma diminuição no decimo dia de análise, o estresse hídrico diminui seus pigmentos fotossintetizantes no quinto dia e aumento no décimo. Com o intuito de compreender melhor como essa combinação de estresse atua nas L. aequinoctialis, outras análises serão realizadas assim como adição de outros níveis de PEG 6000 e tempo de microgravidade simulada.

Referências

ALBERGARIA, Edward Teixeira; OLIVEIRA, Antônio Fernando Morais;

ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. South African Journal of Botany, v. 131, p. 12-17, 2020.

BAEK, GahYoung; SAEED, Maham; CHOI, Hyung-Kyoon. Duckweeds: their utilization, metabolites and cultivation. Applied Biological Chemistry, v. 64, n. 1, p. 73, 2021.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

EDO, Great Iruoghene et al. A review on the composition, extraction and applications of phenolic compounds. Ecological Frontiers, v. 45, n. 1, p. 7-23, 2025.

GALON, Leandro et al. Influência dos fatores abióticos na produtividade da cultura do milho. Revista Tropica–Ciências Agrárias e Biológicas, v. 4, n. 3, p. 18, 2010.

GAO, Xiuqing et al. Deciphering the molecular basis for photosynthetic parameters in Bambara groundnut (Vigna subterranea L. Verdc) under drought stress. BMC plant biology, v. 23, n. 1, p. 287, 2023.

ISAH, Tasiu. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biological research, v. 52, 2019.

NIE, Haozhen et al. Exploring plant responses to altered gravity for advancing space agriculture. Plant Communications, v. 6, n. 6, 2025.

OYAIZU, Makoto. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese journal of nutrition and dietetics, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PASOS-PANQUEVA, Johan; BAKER, Alison; CAMARGO-VALERO, Miller Alonso. Unravelling the impact of light, temperature and nutrient dynamics on duckweed growth: A meta-analysis study. Journal of environmental management, v. 366, p. 121721, 2024.

PLAUT, Zvi; FEDERMAN, Evelyn. A simple procedure to overcome polyethelene glycol toxicity on whole plants. Plant physiology, v. 79, n. 2, p. 559-561, 1985.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Eva et al. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: changes on phenolic metabolites and related enzymes. Phytochemistry, v. 72, n. 8, p. 723-729, 2011.

SANTOS, John Weslley Lira. Avaliação do efeito da microgravidade simulada por um clinostato 2D sobre comportamento de Lemna aequinoctialis. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SHIMADA, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 40, n. 6, p. 945–948, 1992.

SONOBE, Rei et al. Estimation of leaf chlorophyll a, b and carotenoid contents and their ratios using hyperspectral reflectance. Remote Sensing, v. 12, n. 19, p. 3265, 2020.

VILLELA, Francisco Amaral; DONI FILHO, Luiz; SEQUEIRA, Eliseo Leclerc. Tabela de Potencial Osmótico em Função da Concentração de Polietilleno Glicol 6.000 e da Temperatura. 1991.

WELLBURN, Alan R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of plant physiology, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

YADAV, Nitesh Kumar et al. Characterization of bioactive metabolites and antioxidant activities in solid and liquid fractions of fresh duckweed (Wolffia globosa) subjected to different cell wall rupture methods. ACS omega, v. 9, n. 18, p. 19940, 2024.

YAN, Weijiao et al. Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in blue honeysuckle. Plants, v. 13, n. 15, p. 2115, 2024.

YANG, Xinyi et al. Response mechanism of plants to drought stress. Horticulturae, v. 7, n. 3, p. 50, 2021.

YANG, Zhaotian et al. Natural chlorophyll: a review of analysis methods, health benefits, and stabilization strategies. Critical reviews in food science and nutrition, v. 65, n. 16, p. 3069-3083, 2025.

YU, Bo; CHAO, Dai-Yin; ZHAO, Yang. How plants sense and respond to osmotic stress. Journal of Integrative Plant Biology, v. 66, n. 3, p. 394-423, 2024.

Anexos



Figura 1: Ensaios in vitro de análise de compostos fenólicos totais em extrato aquoso de L. aequinoctialis.



Figura 2: Ensaios in vitro de análise de proteínas totais em extrato aquoso de L. aequinoctialis.



Figura 3: Ensaios in vitro de análise da atividade de eliminação de radicais livres DPPH em extrato aquoso de L. aequinoctialis



Figura 4: Ensaios in vitro de análise do potencial redutor em extrato aquoso de L. aequinoctialis



Figura 5: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em L. aequinoctialis submetida a 2 horas a 15 RPM.

CÓDIGO: SB1082

AUTOR: THAYNARA LIMA DOS REIS

COAUTOR: CYBELLE MENOLLI LONGHINI

COAUTOR: WALLACE SILVA DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: GUILHERME ORTIGARA LONGO

TÍTULO: Quando o alimento é plástico: efeitos dependentes da concentração de microplásticos sobre o crescimento de juvenis Abudefduf saxatilis (Linnaeus, 1758)

Resumo

A poluição por plásticos é uma das principais ameaças aos ecossistemas marinhos. Plásticos expostos ao intemperismo reduzem de tamanho, tornando-se microplásticos (MPs), partículas <5 mm que se acumulam em sedimentos, água e organismos marinhos. Este estudo avaliou os efeitos da exposição crônica a MPs (250-125 µm) sobre o crescimento de juvenis de *Abudefduf saxatilis* (Pomacentridae), avaliando crescimento corporal, massa, índice hepatossomático e sobrevivência. Quarenta juvenis foram coletados em poças de maré na Praia de Mãe Luíza (RN) e submetidos a tratamentos por seis semanas: controle (ração exclusiva), baixa exposição (20% MPs + 80% ração na dieta) e alta exposição (80% MPs + 20% ração), simulando cenários distintos de contaminação. Os MPs vieram do mesmo ambiente costeiro, conferindo realismo ecológico. A alta exposição induziu a perda de 16,7% da massa, incremento de 3,8% no comprimento, redução de 67,3% no IHS e mortalidade de 30%, sendo esse último seis vezes superior ao controle. A baixa exposição não diferiu significativamente do controle, sugerindo compensação fisiológica. Portanto, há uma relação clara entre concentração de MPs e severidade dos efeitos, com concentrações elevadas excedendo a capacidade homeostática dos juvenis, induzindo catabolismo, disfunção hepática, mortalidade e vulnerabilidade à predação. Diante do aumento de MPs em ambientes costeiros tropicais, os achados indicam riscos ecotoxicológicos relevantes para peixes recifais generalistas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia marinha. Poluição por plásticos. Pomacentridae.

TITLE: When food is plastic: microplastic concentration-dependent effects on the growth of juvenile Abudefduf saxatilis (Linnaeus, 1758)

Abstract

Plastic pollution is one of the main threats to marine ecosystems. Plastics exposed to weathering break down in size, becoming microplastics (MPs), particles <5 mm that accumulate in sediments, water, and marine organisms. This study evaluated the effects of chronic exposure to MPs (250-125 µm) on the growth of juvenile *Abudefduf saxatilis* (Pomacentridae), assessing body growth, mass, hepatosomatic index, and survival. Forty juveniles were collected from tide pools at Mãe Luíza Beach (RN) and subjected to treatments for six weeks: control (exclusive feed), low exposure (20% MPs + 80% feed in the diet), and high exposure (80% MPs + 20% feed), simulating different contamination scenarios. The MPs came from the same coastal environment, providing ecological realism. High exposure caused a 16.7% loss of mass, a 3.8% increase in length, a 67.3% decrease in IHS, and 30% mortality, which was six times higher than the control. The low exposure didn't differ much from the control, suggesting some physiological compensation. So, there's a clear relationship between MP concentration and the severity of effects, with high concentrations exceeding the juveniles' homeostatic capacity, causing catabolism, liver dysfunction, mortality, and vulnerability to predation. Given the increase of MPs in tropical coastal environments, the findings indicate significant ecotoxicological risks for generalist reef fish.

Keywords: Marine ecotoxicology. Plastic pollution. Pomacentridae.

Introdução

O crescimento é um dos principais parâmetros informativos sobre aptidão (*fitness*) de peixes. Sua taxa determina o tempo de permanência em tamanhos vulneráveis à predação, idade de maturação sexual e sucesso reprodutivo (Wang *et al.*, 2021, 2024). Avaliar como um contaminante afeta o crescimento permite inferir potenciais consequências em escala populacional e não apenas um efeito fisiológico isolado.

A poluição plástica constitui uma das ameaças ambientais mais urgentes e difundidas nos ecossistemas marinhos. Estima-se a entrada de 4,8 a 12,7 milhões de toneladas de plásticos, nos oceanos, por ano (Jambeck *et al.*, 2015). No ambiente marinho, esses materiais se degradam tornando-se microplásticos (MPs), os quais são definidos como fragmentos plásticos menores que 5 mm (GESAMP, 2015). Diferentemente dos macroplásticos, os MPs são persistentes e de difícil remoção, acumulando-se em sedimentos, água e organismos marinhos (Cole *et al.*, 2011; Lusher *et al.*, 2017). Ambientes costeiros tropicais, próximos a centros urbanos, apresentam concentrações elevadas de MPs, devido ao aporte de resíduos mal gerenciados e a correntes que os concentram localmente.

A ingestão de MPs, por organismos marinhos, é amplamente documentada desde invertebrados planctônicos a grandes vertebrados (Barboza *et al.*, 2018; Guzzetti *et al.*, 2018). Em peixes, a ingestão pode ocorrer diretamente, por confusão dos MPs com presas naturais, ou indiretamente, por transferência trófica (Rochman *et al.*, 2015) (Figura 1). Independente da forma de ingestão, os MPs podem causar obstrução do trato gastrointestinal, falsa saciedade, lesões histopatológicas e comprometimento da absorção de nutrientes (Pedà *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016; Nair & Perumal, 2024).

A magnitude dos efeitos ecotoxicológicos depende da concentração, duração da exposição, tamanho, tipo de polímero e da espécie exposta ao contaminante (Cormier *et*

al., 2021; 2022; Nair & Perumal, 2024). Na literatura, é observado que exposições à altas concentrações de MPs resultam na redução do crescimento, comprometimento reprodutivo e mortalidade (Naidoo & Glassom, 2019). Enquanto baixas concentrações costumam gerar efeitos subletais menos evidentes, mascarados por respostas compensatórias (Wen *et al.*, 2018).

Ecossistemas recifais tropicais sustentam assembleias de peixes complexas, nas quais peixes de pequeno porte, como os Pomacentridae, desempenham papéis ecológicos essenciais na dinâmica trófica e estruturação de comunidades bentônicas (Leis & McCormick, 2002). Apesar do reconhecimento crescente sobre os impactos dos MPs, em ambientes marinhos permanece uma lacuna quanto a peixes recifais tropicais, sobretudo com MPs ambientais intemperizados.

Neste contexto, o presente estudo avaliou os efeitos da ingestão de MPs sobre o crescimento de juvenis de *Abudefduf saxatilis* em condições controladas. O delineamento simulou dois cenários de contaminação, um com baixa exposição (20% MPs + 80% de ração comercial na dieta) e outro com alta exposição (80% MPs + 20% de ração), além de um grupo controle alimentado exclusivamente pela ração. Foram usados MPs ambientais (250-125 µm) coletados no mesmo ambiente costeiro dos organismos. Desse modo, buscou-se comparar o crescimento (comprimento, massa corporal e índice hepatossomático) entre os grupos, como também verificar se a presença de MPs compromete a discriminação alimentar dos indivíduos. Com base nesse desenho, testaram-se as hipóteses: (H1) o tratamento de alta exposição de MPs (80%) reduzirá o ganho de comprimento, massa e IHS, em razão do menor aporte nutricional efetivo da dieta; (H2) o tratamento de baixa exposição (20%) não produzirá efeitos detectáveis nesses parâmetros, dado o menor comprometimento proporcional da ingestão e (H3) os indivíduos não discriminarão MPs da ração durante o forrageamento, ingerindo ativamente ambos, em consonância com o comportamento alimentar generalista da espécie.

Metodologia

A. saxatilis (Linnaeus, 1758), popularmente conhecido como sargentinho, foi a espécie modelo utilizada (Figura 2). Trata-se de um peixe pertencente à família Pomacentridae, territorialista, onívoro, com baixa importância comercial e ampla distribuição global. Espécimes adultos apresentam comprimento médio de 15 cm, coloração azulada com dorso amarelado e cinco faixas verticais escuras (Nunes *et al.*, 2023).

Possuem alta plasticidade na utilização do habitat, forrageando desde a coluna d'água até substratos bentônicos (Fishelson, 1970). A exploração de diferentes estratos, abundância e facilidade de manutenção em laboratório fundamentaram a escolha dessa espécie como modelo, dado o elevado potencial de interação com partículas plásticas suspensas.

Em 15/07/2025, 40 juvenis (1,48 ± 0,14 cm de comprimento) foram coletados com puçás em poças na Praia de Mãe Luíza/RN (5°47'43.7"S; 35°10'55.4"W). O local é formado por arenito de praia, com poças que ficam expostas em marés baixas. Embora localizada em perímetro urbano, a praia é pouco utilizada para recreação, mas situa-se próximo a

empreendimentos hoteleiros e possui correntes de deriva litorânea que promovem a deposição de resíduos sólidos (Figura 3).

Em 26/05/2025, macroplásticos foram coletados na vegetação costeira da mesma praia, priorizando fragmentos em avançado processo de intemperismo, caracterizados por superfície ressecada e fragilidade mecânica.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Experimentação Aquática, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), lavadas com água doce e secaram à temperatura ambiente, com fins de preservar o biofilme e características ecológicas representativas de plásticos ambientais passíveis de ingestão pela biota marinha. Posteriormente, foram reduzidas de tamanho com tesoura e trituradas em liquidificador doméstico. Os fragmentos foram peneirados em malhas decrescentes (2,0 mm a 125 µm), sendo selecionadas partículas entre 250-125 µm, compatíveis com a definição de MPs e a capacidade digestiva da espécie (Figura 4).

Os peixes foram distribuídos em pares, devido ao comportamento gregário em ambientes naturais. Foram utilizados 20 aquários de 30L (25 × 40 × 30 cm), utilizando água do mar natural sob recirculação contínua, através de um sump de 62 L contendo filtros mecânicos e skimmer. Além de iluminação artificial controlada e parâmetros físico-químicos estáveis (temperatura 27°C; salinidade 36 PSU; fotoperíodo 12h claro e 12h escuro).

A aclimatação durou 7 dias, visando mitigar o estresse decorrente da captura e padronizar as condições fisiológicas iniciais. Durante esse período, os animais foram alimentados, duas vezes ao dia, com ração comercial para peixes marinhos (Poytara Marinhos P Black Line).

O delineamento consistiu em grupo controle (n=20) e tratamentos de exposição crônica a microplásticos na dieta: alta concentração (80%; n=10) e baixa concentração (20%; n=10) (Figura 5). Os níveis de exposição foram baseados em Critchell *et al.* (2018), adaptados às limitações logísticas do laboratório.

O grupo controle continuou recebendo ração, até o fim do experimento, duas vezes ao dia (10h e 17h). A quantidade diária de ração foi calculada conforme equação adaptada de Critchell *et al.* (2018): "$alimento\ total\ (g) = [(peso_1 + peso_2) / 2] \times 0{,}04$", onde $peso_1$ e $peso_2$ correspondem às massas corporais dos indivíduos pareados no aquário e 0,04 representa 4% da biomassa média do par. Enquanto isso, os grupos experimentais receberam ração e MPs, ofertados simultaneamente na superfície, com taxas de afundamento similares, favorecendo a mistura na coluna d'água nas proporções: (20% MPs) $microplásticos = 0{,}20 \times alimento\ total\ (g)$; $ração = 0{,}80 \times alimento\ total\ (g)$; (80% MPs) $microplásticos = 0{,}80 \times alimento\ total\ (g)$; $ração = 0{,}20 \times alimento\ total\ (g)$. Os peixes forrageavam ativamente ambos componentes, corroborando com o caráter generalista da espécie. Após cada alimentação, os aquários eram limpos com sifão.

Semanalmente, as quantidades de alimento e MPs eram recalculadas, assim como ocorria limpeza total com troca de 30% da água. Além do monitoramento do peso, em balança eletrônica semi analítica, e comprimento através de fotografias sob malha milimetrada.

Foram registradas cinco mortes: 1 no controle, 1 no tratamento 20% MPs e 3 no 80% MPs, os indivíduos foram removidos dos aquários e não incluídos nas análises. O

tamanho amostral final foi de n=19 para controle, n=9 para 20% MPs e n=7 para 80% MPs.

Ao final, os sobreviventes foram eutanasiados, por imersão em eugenol 10%, e dissecados para extração do trato gastrointestinal, onde o fígado foi pesado individualmente. O comprometimento hepático foi avaliado através do índice hepatossomático (IHS), um bioindicador comumente utilizado para avaliar a condição nutricional e exposição a contaminantes, sendo calculado como: "*IHS = (massa do fígado / massa corporal total) × 100*", conforme Critchell *et al.* (2018).

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme os princípios éticos de experimentação animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN sob certificado nº 442.024/2025.

O comprimento foi analisado por Modelo Linear Misto [comprimento ~ tratamento × tempo + (1|id)], com ANOVA tipo III (Satterthwaite) e post-hoc via emmeans (Tukey). A massa corporal foi analisada por Modelo Linear Generalizado Misto com distribuição lognormal e função de ligação logarítmica [log(peso) ~ tratamento × tempo + (1|id)], selecionado pelo menor AIC frente aos modelos gamma e gaussiano, validado por simulação de resíduos (DHARMa). O IHS, por não atender ao pressuposto de normalidade, foi analisado por Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn e correção de Bonferroni. A sobrevivência entre tratamentos foi comparada por teste de Fisher. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$ em todas as análises, realizadas no RStudio (R Core Team, 2024) com os pacotes lmerTest, glmmTMB, DHARMa, emmeans, rstatix, FSA e ggplot2.

Resultados e Discussões

3.1 Comprimento total

O Modelo Linear Misto revelou efeito significativo do tempo experimental sobre o comprimento corporal ($F = 15,44$; $p < 0,001$) e interação significativa entre tratamento e tempo ($F = 4,08$; $p < 0,001$), indicando trajetórias de crescimento divergentes entre os grupos ao longo das seis semanas de exposição (Gráfico 1; Tabela 1). No controle, os indivíduos cresceram de forma consistente de 7,79 ± 0,44 cm (S0) a 9,37 ± 0,44 cm (S6), incremento de 20,3%. O grupo de baixa exposição (20% MPs) exibiu padrão similar, de 8,46 ± 0,65 cm (S0) a 10,07 ± 0,65 cm (S6), incremento de 19,0%, sem diferenças estatísticas em relação ao controle em nenhum tempo avaliado. Em contraste, o grupo de alta exposição (80% MPs) apresentou crescimento lento de 7,83 ± 0,73 cm (S0) a 8,13 ± 0,73 cm (S6), incremento de apenas 3,8%, com menor variabilidade dos dados e estagnação a partir de S2. O efeito do tratamento isoladamente não foi significativo ($F = 0,85$; $p = 0,438$), evidenciando que os grupos eram comparáveis no início do experimento e que as diferenças emergiram progressivamente ao longo do tempo.

3.2 Massa corporal

O Modelo Linear Generalizado Misto, com distribuição lognormal, revelou efeito significativo do tempo ($x^2 = 473,46$; gl = 6; $p < 0,001$) e interação significativa entre tratamento e tempo ($x^2 = 101,83$; gl = 12; $p < 0,001$) sobre a massa corporal, sem efeito significativo de tratamento isoladamente ($x^2 = 1,99$; gl = 2; $p = 0,369$), confirmando grupos comparáveis no início do experimento (Gráfico 2; Tabela 2). O grupo controle apresentou aumento contínuo de peso de 1,34 ± 0,25 g (S0) a 2,19 ± 0,25 g (S6), ganho líquido de 63,4%. O grupo de baixa exposição (20%) exibiu desempenho similar de 1,64 ± 0,36 g (S0) a 2,48 ± 0,36 g (S6), incremento de 51,2%, sem diferenças estatísticas significativas ao controle em nenhum tempo avaliado, exceto uma leve desaceleração em S5 ($z = -2,35$; $p = 0,019$). Em contraste, o grupo de alta exposição (80%) sofreu decréscimo progressivo de massa de 1,20 ± 0,41 g (S0) a 1,00 ± 0,41 g (S6), perda líquida de 16,7%. As interações negativas tratamento × tempo tornaram-se significativas a partir de S2 ($z = -2,02$; $p = 0,044$), agravando-se progressivamente até S6 ($z = -7,57$; $p = 0,001$), indicando catabolismo.

3.3 Índice hepatossomático (IHS)

Ao término do experimento (S6), o teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($H = 9,35$; gl = 2; $p = 0,009$) (Gráfico 3; Tabela 3). O grupo controle apresentou o maior IHS médio (2,63 ± 0,29%). O grupo de baixa exposição (20%) exibiu IHS intermediário (1,95 ± 0,36%), redução de 25,9% em relação ao controle, sem significância estatística no post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni. Enquanto, o grupo de alta exposição (80%) apresentou o menor IHS (0,86 ± 0,16%), equivalente a apenas 32,7% do valor do controle, diferença estatisticamente significativa (Dunn/Bonferroni: $p = 0,007$). A redução do IHS no grupo 80% MPs, associada à perda simultânea de massa corporal, indica catabolismo e mobilização de reservas hepáticas sob déficit nutricional crônico.

3.4 Sobrevivência

A sobrevivência ao final do experimento (S6) foi de 95% no controle (mortalidade de 5%), 90% no grupo de baixa exposição (20% MPs; mortalidade de 10%) e 70% no grupo de alta exposição (80% MPs; mortalidade de 30%) (Gráfico 4). A mortalidade no grupo de 80% MPs foi seis vezes superior à do controle, concentrando-se nas semanas finais, coincidindo com o período de maior perda de massa e queda do IHS. Essa diferença não atingiu significância estatística no teste de Fisher ($p = 0,202$), provavelmente em razão do reduzido tamanho amostral e do baixo número absoluto de óbitos.

3.5 Confirmação da ingestão de microplásticos

A ingestão efetiva de MPs pelos indivíduos foi confirmada por três linhas de evidências convergentes. A primeira delas foi a inspeção visual do TGI, sendo realizada durante a dissecção, a qual revelou partículas coloridas de microplásticos retidas ao longo do TGI dos indivíduos, constituindo evidência direta da ingestão (Figura 6). Adicionalmente, observou-se, ao longo do período experimental, forrageamento ativo e simultâneo de ração e MPs ofertados na superfície da água, sem qualquer sinal de rejeição ou discriminação entre os componentes. Por fim, a relação entre concentração de MPs na dieta e magnitude dos efeitos fisiológicos (lentidão no crescimento longitudinal, perda de massa e redução do IHS) constitui evidência indireta adicional assinatura característica de causalidade em ecotoxicologia.

Discussão

Os resultados de comprimento corroboram e complementam os de massa corporal, evidenciando que a exposição crônica a altas concentrações de microplásticos (80%) induz o retardo do crescimento. O incremento de apenas 3,8% no grupo de alta exposição (80%), contrastando com 20,3% no controle e 19,0% na baixa exposição (20%), é comparável a estudos anteriores. Naidoo & Glassom (2019) relataram redução do crescimento em *Ambassis dussumieri*, associada a mortalidade após 95 dias de exposição. Cormier *et al.* (2021, 2022) observaram crescimento reduzido em peixe-zebra e medaka marinho, após exposição crônica com magnitude dependente do tipo de polímero. Já Nair & Perumal (2024) documentaram supressão do crescimento em tilápia-do-nilo exposta a MPs de polipropileno e polietileno. Coletivamente, esses achados indicam que o crescimento de teleósteos é comprometido quando MPs substituem, parcial ou totalmente, o alimento natural em exposições crônicas.

O crescimento no grupo de 20% MPs, similar ao controle, é consistente com os achados de massa corporal e IHS. Esses resultados reforçam a hipótese da capacidade fisiológica compensatória sob baixas concentrações, preservando funções vitais como crescimento, embora possam ocorrer custos em níveis moleculares e bioquímicos não avaliados neste estudo (Capó *et al.*, 2021; Solomando *et al.*, 2020).

A perda de massa corporal, no tratamento 80% MPs, pode ser atribuída a múltiplos mecanismos fisiológicos correlacionados, decorrentes da ingestão crônica de MPs como, por exemplo, bloqueio mecânico do trato gastrointestinal (TGI), falsa saciedade por distensão gástrica e interrupção de processos digestivos normais, privando a absorção de nutrientes essenciais (Nair & Perumal, 2024). De maneira similar, Critchell & Hoogenboom (2018) demonstraram que, quando MPs substituem parcialmente o alimento, peixes crescem mais lento e perdem a massa corporal, com os efeitos sendo intensificados em concentrações maiores. Adicionalmente, MPs podem induzir lesões histopatológicas no TGI e respostas inflamatórias que desviam recursos energéticos de funções anabólicas (Pedà *et al.*, 2016). No presente estudo, a substituição de 80% da ração por MPs provavelmente resultou em déficit energético, forçando os indivíduos a mobilizar reservas para manutenção metabólica basal, culminando no catabolismo observado. Esse cenário é particularmente crítico para juvenis em ambiente natural, uma vez que se encontram em fase de elevada demanda energética para crescimento e maturação sexual. Trata-se de um risco concreto, e não hipotético, visto que estimativas indicam a entrada de 4,8 a 12,7 milhões de toneladas de plástico, nos oceanos, por ano (Jambeck *et al.*, 2015), material passível de consumo direto ou indireto por peixes marinhos.

O tratamento de 20% MPs não produziu comprometimento na massa corporal, embora tenha havido leve desaceleração nas fases finais (S5-S6), sugerindo que baixas concentrações podem se tornar progressivamente prejudiciais ao longo do tempo. Esses resultados convergem com estudos que reportaram ausência de efeitos sobre crescimento, em determinadas condições experimentais. Wen *et al.* (2018) não observaram efeitos adversos no crescimento de *Symphysodon aequifasciatus* após 30 dias de exposição a poliestireno, apesar de alterações em biomarcadores de estresse oxidativo. Enquanto, estudos com dourada (*Sparus aurata*) não reportaram impacto sobre crescimento após 90 dias, embora tenham sido observadas respostas oxidativas e inflamatórias no fígado e intestino (Capó *et al.*, 2021; Solomando *et al.*, 2020). Isso sugere que, sob baixas

concentrações e disponibilidade alimentar adequada, peixes podem compensar parcialmente os efeitos negativos de MPs, ainda que com custos energéticos que podem se manifestar em escalas temporais mais prolongadas.

A família Pomacentridae tem emergido como modelo relevante em estudos sobre impactos de microplásticos em peixes recifais. McCormick *et al.* (2020) documentaram que juvenis de *Pomacentrus amboinensis* expostos a MPs, por quatro dias, exibiram maior atividade locomotora e menor sobrevivência em campo, evidenciando comprometimento do comportamento antipredatório, mesmo em exposições agudas. Santana *et al.* (2021) reportaram ingestão ativa de partículas por *P. amboinensis* em concentrações ambientalmente relevantes. Critchell & Hoogenboom (2018) demonstraram que juvenis de *A. polyacanthus* toleraram MPs de tamanho similar ao alimento natural (~2 mm), mas a retenção no TGI aumentou com partículas de 300-125 µm, faixa compatível com a utilizada neste estudo (250-125 µm), reforçando que microplásticos, na faixa de tamanho do zooplâncton, constituem ameaça particular a peixes recifais generalistas, devido à sobreposição com o espectro de presas naturais e à limitada discriminação sensorial durante o forrageamento.

A opção por partículas coletadas diretamente do ambiente costeiro, em vez de microesferas comerciais virgens, conferiu maior realismo ecológico ao experimento. Plásticos ambientais carreiam biofilmes e contaminantes adsorvidos que podem modular a toxicidade e palatabilidade (Pittura *et al.*, 2018). Considerando que cenários futuros de intensificação da poluição plástica marinha projetam concentrações crescentes de MPs em ambientes costeiros (Cormier *et al.*, 2021; Silva-Pinto *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2021), os resultados do tratamento de alta exposição deste estudo podem representar um retrato cada vez mais realista dessas condições.

A redução do IHS, no grupo de 80% MPs, associada à perda simultânea de massa corporal, indica catabolismo e mobilização de reservas hepáticas sob déficit nutricional. O fígado é órgão central no metabolismo energético de teleósteos, responsável pelo armazenamento de glicogênio, lipídios, síntese proteica e detoxificação. Por esse motivo, o IHS é amplamente utilizado como bioindicador de condição nutricional e exposição a contaminantes (Critchell & Hoogenboom, 2018). Estudos com *Cyprinus carpio* expostos a poliestireno, por 75 dias, demonstraram alteração de 40% no IHS (Gheorghe *et al.*, 2025). Além de ter sido documentadas lesões hepáticas estruturais (necrose, vacuolização, infiltração leucocitária) em espécies como *Clarias gariepinus*, *Oreochromis niloticus*, *Carassius auratus* e *Channa punctata* (Hamed *et al.*, 2021; Hoseini *et al.,* 2022; Sun *et al.*, 2024). A redução observada, neste trabalho, em *A. saxatilis* pode ser atribuída ao déficit nutricional pela substituição de 80% da ração por MPs, resultando em atrofia hepática, além de possíveis respostas inflamatórias que desviam recursos de funções anabólicas (Sun *et al.*, 2024; Capó *et al.*, 2021).

A manutenção do IHS no grupo de 20% MPs, embora numericamente reduzida em 25,9%, não atingiu significância estatística, sugerindo compensação hepática sob baixa exposição. Contudo, a ausência de efeitos significativos não implica ausência de impactos fisiológicos. Estudos demonstram que, mesmo sem alterações evidentes no crescimento, a exposição a MPs induz alterações moleculares, bioquímicas e histológicas que podem comprometer o desempenho a longo prazo (Umamaheswari *et al.*, 2021; Kaloyianni *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2024).

A mortalidade de 30% no grupo de alta exposição, seis vezes superior ao controle, embora sem significância estatística, devido ao limitado tamanho amostral, apresenta padrão biologicamente relevante e temporalmente concentrado nas semanas finais, coincidindo com a maior perda de massa e queda do IHS. Sugerindo que os óbitos resultaram de deterioração progressiva da condição fisiológica sob déficit nutricional e estresse metabólico crônico.

Em peixes, o crescimento está diretamente associado a vulnerabilidade à predação, competitividade por recursos, capacidade de termorregulação e sucesso reprodutivo (Wang *et al.*, 2021, 2024; Silva-Pinto *et al.*, 2025). O comprometimento do crescimento em estágios iniciais mantém os indivíduos em tamanhos vulneráveis por períodos prolongados, aumentando a probabilidade de predação e reduzindo as chances de atingir tamanho crítico para maturação sexual (Naidoo & Glassom, 2019). Em espécies recifais como *A. saxatilis*, nas quais o tamanho corporal influencia o acesso a refúgios e a capacidade de defesa territorial, a lentidão no crescimento pode comprometer o sucesso ecológico individual. Adicionalmente, reservas hepáticas reduzidas implicam menor capacidade de suportar escassez alimentar, menor investimento reprodutivo e menor resistência a doenças e estressores ambientais (Brown & Murphy, 2004; Rossi *et al.*, 2015; Schilling *et al.*, 2025). Considerando que ambientes costeiros tropicais, próximos a centros urbanos, apresentam concentrações crescentes de MPs, os resultados sugerem que populações naturais de *A. saxatilis* e de outras espécies recifais generalistas podem estar expostas a riscos ecotoxicológicos significativos, com potencial comprometimento estrutural e funcional das assembleias de peixes recifais.

O desenho experimental, sobretudo o tratamento de alta exposição (80% MPs), não visou induzir inanição, e sim conhecer os limites da capacidade fisiológica de peixes recifais, diante de um cenário de degradação ambiental plausível, projetado a partir do aumento observado de resíduos plásticos costeiros (Jambeck *et al.*, 2015; Cormier *et al.*, 2021). Embora a poluição plástica marinha seja visualmente evidente em praias urbanas e amplamente documentada na literatura, permanecia pouco explorada se, e em que magnitude, peixes recifais tropicais ingerem MPs ambientais e como são afetados por eles fisiologicamente. Este estudo buscou justamente estabelecer essa resposta inicial, a partir de uma população local, como base empírica replicável para investigações futuras em escalas bioquímica e moleculares, aprofundando a compreensão dos mecanismos de toxicidade evidenciados.

Essa resposta inicial também oferece subsídio para políticas públicas de mitigação da poluição plástica costeira, já que os impactos ecotoxicológicos documentados não se restringem ao ambiente marinho. Alterações na estrutura e na funcionalidade de assembleias de peixes recifais podem repercutir sobre atividades econômicas dependentes da saúde dos recifes, como o turismo e segurança alimentar humana. A bioacumulação de microplásticos e de contaminantes associados, ao longo da teia trófica, levanta preocupações emergentes quanto a efeitos sobre consumidores humanos desse pescado, incluindo possíveis alterações epigenéticas ainda pouco compreendidas (Barboza *et al.*, 2018). Portanto, compreender os efeitos ecotoxicológicos de microplásticos em peixes recifais tropicais constitui não apenas contribuição ecológica, mas subsídio científico para a mitigação de riscos ecológicos e socioeconômicos interligados.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que a exposição crônica a microplásticos (250-125 µm) afeta o crescimento de *A. saxatilis* de forma dose-dependente. A substituição de 80% da dieta por MPs resultou em efeitos deletérios como perda de massa corporal, lentidão no crescimento longitudinal, redução no índice hepatossomático e mortalidade. Em contraste, a exposição a 20% de MPs não comprometeu significativamente a biomassa, comprimento, IHS ou sobrevivência, sugerindo capacidade compensatória sob baixas exposições, embora custos fisiológicos possam se manifestar em escalas temporais mais prolongadas.

Os exemplares submetidos ao tratamento com MPs não apresentaram capacidade de discriminação entre partículas de microplástico e alimento natural, forrageando ativamente ambos os componentes sem distinção aparente, comportamento consistente com a estratégia alimentar generalista da espécie. A presença de MPs coloridos, ao longo do TGI dos indivíduos dissecados, confirmou a ingestão efetiva das partículas, corroborando a ausência de discriminação sensorial.

Os resultados demonstram relação clara entre concentração de MPs na dieta e severidade dos efeitos ecotoxicológicos, com concentrações elevadas excedendo a capacidade homeostática de juvenis, induzindo ao catabolismo, disfunção hepática e mortalidade. O comprometimento do crescimento prolonga a vulnerabilidade à predação, retarda a maturação sexual e compromete a aptidão individual, com potenciais consequências para a dinâmica populacional de espécies recifais generalistas.

A. saxatilis demonstrou ser um organismo modelo adequado para estudos ecotoxicológicos com peixes recifais tropicais. O uso de microplásticos ambientais, em vez de partículas virgens, conferiu maior realismo ecológico aos resultados. Considerando que ambientes costeiros tropicais apresentam concentrações crescentes de MPs resultados indicam riscos ecotoxicológicos significativos para populações de peixes recifais, reforçando a urgência de políticas públicas voltadas à redução da produção de plásticos descartáveis, ao aprimoramento da gestão de resíduos sólidos e à restauração de zonas costeiras impactadas.

Para além do ambiente marinho, esses riscos projetam-se sobre atividades humanas dependentes da saúde dos recifes e sobre a segurança alimentar associada ao consumo de pescado, reforçando que a mitigação da poluição plástica costeira constitui também uma pauta socioeconômica, e não apenas ambiental. Estudos futuros devem investigar efeitos em escalas temporais prolongadas, conduzir análises histopatológicas e bioquímicas, assim como monitorar populações naturais para validar estes achados experimentais em condições reais.

Referências

BARBOZA, L. G. A. et al. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 336-348, 2018.

BARBOZA, L. G. A. et al. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. **Science of the Total Environment**, v. 717, 134625, 2020.

BROWN, M.; MURPHY, B. Seasonal dynamics of direct and indirect condition indices in relation to energy allocation in largemouth bass *Micropterus salmoides*. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 13, p. 23-36, 2004.

CAPÓ, X. et al. Long-term exposure to virgin and seawater exposed microplastic enriched-diet causes liver oxidative stress and inflammation in gilthead seabream *Sparus aurata*. **Science of the Total Environment**, v. 767, 144976, 2021.

COLE, M. et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2588-2597, 2011.

CORMIER, B. et al. Environmental microplastics disrupt swimming activity in acute exposure in *Danio rerio* larvae and *Oryzias melastigma* juveniles. **Environmental Pollution**, v. 284, 117552, 2021.

CORMIER, B. et al. Chronic feeding exposure to virgin and spiked microplastics disrupts essential biological functions in teleost fish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 415, 125626, 2021.

CORMIER, B. et al. Chemicals sorbed to environmental microplastics are toxic to early life stages of aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, 111665, 2022.

CRITCHELL, K.; HOOGENBOOM, M. O. Effects of microplastic exposure on the body condition and behaviour of planktivorous reef fish (*Acanthochromis polyacanthus*). **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, e0193308, 2018.

FISHELSON, L. Behaviour and ecology of a population of *Abudefduf saxatilis* (Pomacentridae, Teleostei) at Eilat (Red Sea). **Animal Behaviour**, v. 18, n. 2, p. 225-237, 1970.

GESAMP. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Rep. Stud. GESAMP, n. 90, 96 p., 2015.

GHEORGHE, S. et al. Ecotoxicological Effects of Polystyrene Particle Mix (20, 200, and 430 μm) on *Cyprinus carpio*. **Toxics**, v. 13, n. 4, 246, 2025.

GUZZETTI, E. et al. Microplastic in marine organisms: Environmental and toxicological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 64, p. 164-171, 2018.

HAMED, M.; SOLIMAN, H. A. M.; BADREY, A. E. A.; OSMAN, A. G. M. Microplastics induced histopathological lesions in some tissues of tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juveniles. **Tissue and Cell**, v. 71, 101512, 2021.

HOSEINI, S. M. et al. Hepatic transcriptomic and histopathological responses of common carp, *Cyprinus carpio*, to copper and microplastic exposure. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, 113401, 2022.

JAMBECK, J. R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768-771, 2015.

KALOYIANNI, M. et al. Toxicity and Functional Tissue Responses of Two Freshwater Fish after Exposure to Polystyrene Microplastics. **Toxics**, v. 9, 289, 2021.

LEIS, J. M.; MCCORMICK, M. I. The biology, behavior, and ecology of the pelagic, larval stage of coral reef fishes. In: SALE, P. F. (Ed.). **Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem**. San Diego: Academic Press, p. 171-200, 2002.

LU, Y. et al. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p. 4054-4060, 2016.

LUSHER, A. L.; WELDEN, N. A.; SOBRAL, P.; COLE, M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. **Analytical Methods**, v. 9, n. 9, p. 1346-1360, 2017.

MCCORMICK, M. I. et al. Microplastic exposure impairs anti-predator behaviour in juvenile reef fish. 2020.

NAIDOO, T.; GLASSOM, D. Decreased growth and survival in small juvenile fish, after chronic exposure to environmentally relevant concentrations of microplastic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 145, p. 254-259, 2019.

NAIR, H. T.; PERUMAL, S. Growth performance, hematological and oxidative stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to polypropylene microplastics. **Environmental Quality Management**, v. 34, 22179, 2024.

NUNES, J. A. C. C.; SAMPAIO, C. L. S.; BARROS, F. *Abudefduf saxatilis*. In: **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD, 2023.

PEDÀ, C. et al. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 251-256, 2016.

PITTURA, L. et al. Microplastics as Vehicles of Environmental PAHs to Marine Organisms: combined chemical and physical hazards to the mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, 2018.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024.

ROCHMAN, C. M. et al. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. **Scientific Reports**, v. 5, 14340, 2015.

ROSSI, A.; CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; CAMPANA, M.; PARMA, M. Physiological and metabolic adjustments of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) during starvation. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 161-170, 2015.

SANTANA, M. F. M. et al. Ingestion and Depuration of Microplastics by a Planktivorous Coral Reef Fish, *Pomacentrus amboinensis*. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 2021.

SCHILLING, J.; HUSSEY, N.; HEDGES, K.; BARKLEY, A. Non-invasive ultrasound measurements for determination of hepato-somatic index in Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). **Journal of Fish Biology**, 2025.

SILVA-PINTO, T. et al. Chronic LDPE microplastic ingestion: oxidative stress and mutagenicity in reef fish *Stegastes fuscus*. **Marine Environmental Research**, v. 211, 107362, 2025.

SOLOMANDO, A. et al. Long-Term Exposure to Microplastics Induces Oxidative Stress and a Pro-Inflammatory Response in the Gut of *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. **Environmental Pollution**, v. 266, 115295, 2020.

SUN, Y. et al. Hazards of microplastics exposure to liver function in fishes: a systematic review and meta-analysis. **Marine Environmental Research**, v. 196, 106423, 2024.

UMAMAHESWARI, S.; PRIYADARSHINEE, S.; BHATTACHARJEE, M.; KADIRVELU, K.; RAMESH, M. Exposure to polystyrene microplastics induced gene modulated biological responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 281, 128592, 2021.

WANG, J. et al. Adaptation of life-history traits and trade-offs in marine medaka (*Oryzias melastigma*) after whole life-cycle exposure to polystyrene microplastics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 414, 125537, 2021.

WANG, J. et al. Meta-analysis of the effects of microplastic on fish: insights into growth, survival, reproduction, oxidative stress, and gut microbiota diversity. **Water Research**, v. 267, 122493, 2024.

WEN, B. et al. Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an *Amazonian cichlid*. **Aquatic Toxicology**, v. 195, p. 6, 2018.

Anexos



Figura 1. Representação das fontes emissoras de plásticos e processamento dos microplásticos.



Figura 2. Espécie modelo do estudo (A. saxatilis)



Figura 3. Localização do ponto amostral.



Figura 4. Microplásticos utilizados no experimento (250 - 125 µm) observados no microscópio.



Figura 5. Delineamento experimental.



Figura 6. Trato gastrointestinal de A. saxatilis.



Gráfico 1. Variação do comprimento total (média ± erro padrão).



Tabela 1. Análise de variância (ANOVA tipo III) do Modelo Linear Misto para comprimento corporal.



Gráfico 2. Variação da massa corporal (média ± erro padrão).



Tabela 2. Modelo Linear Generalizado Misto para massa corporal.



Gráfico 3. Índice hepatossomático (IHS; %).



Tabela 3. Valores médios do índice hepatossomático (IHS).



Gráfico 4. Taxa de sobrevivência (%).

CÓDIGO: SB1089

AUTOR: SARA CRHISTINY MEDEIROS DA CRUZ

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Percepção Pública e Conhecimento Etnozoológico sobre Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) na Matriz Urbana de Natal, RN

Resumo

Este estudo investigou a percepção pública e o conhecimento etnozoológico da população de Natal (RN) sobre as moscas-das-frutas (Tephritidae) por meio de um questionário online com 385 respostas válidas. Os resultados revelaram forte estigma associado ao termo "mosca", ligado a "sujeira/doenças" e "incômodo". Embora cerca de 240 participantes tenham declarado conhecer o inseto, o teste visual evidenciou um acentuado Déficit Lineano, com confusão entre a praga Anastrepha fraterculus e a mosca-do-vinagre (Drosophila sp.). No cotidiano, 220 participantes relataram contato direto com frutos infestados ("bicho-da-goiaba"), mas o manejo adotado baseia-se em métodos tradicionais e químicos amadores, enquanto o Manejo Integrado de Pragas (MIP) restringe-se a pós-graduados. Conclui-se haver uma desconexão entre a convivência e o conhecimento técnico, o que representa riscos indiretos ao status fitossanitário do estado na exportação de frutas. O estudo aponta a necessidade de ações de educação ambiental e divulgação científica para transformar a percepção pública em vigilância participativa.

Palavras-chave: Entomologia urbana. Divulgação Científica. Educação Ambiental.

TITLE: Public Perception and Ethnozoological Knowledge about Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in the Urban Matrix of Natal – RN

Abstract

This study investigated the public perception and ethnobiological knowledge of the population of Natal, Rio Grande do Norte, regarding fruit flies (Tephritidae) using an online questionnaire with 385 valid responses. Results revealed a strong stigma associated with the term "fly," linked to "dirt/diseases" and "nuisance." Although about 240 participants claimed prior knowledge, a visual test showed a pronounced Linnean shortfall, with respondents confusing the pest Anastrepha fraterculus with the vinegar fly (Drosophila sp.). Daily interaction was high, as 220 participants reported contact with infested fruits ("guava worms"), but management relied on amateur chemical methods, while Integrated Pest Management (IPM) was restricted to graduates. Findings indicate a disconnection between physical coexistence and technical knowledge, posing indirect risks to the state's phytosanitary status in fruit export. The study highlights the need for science communication and environmental education actions to foster participatory surveillance.

Keywords: Urban entomology. Scientific communication. Environmental education.

Introdução

Os insetos representam o grupo com a maior diversidade de espécies descritas, sendo a ordem Diptera responsável por cerca de 15% dessa riqueza global (STORK, 2018). Embora frequentemente associados apenas a prejuízos, sua importância ecológica é fundamental, atuando na polinização, ciclagem de nutrientes e controle biológico natural (BROWN et al., 2018; COURTNEY et al., 2017).

No contexto agrícola, as moscas-das-frutas (família Tephritidae) destacam-se pelos gêneros Anastrepha Schiner, 1868 e Ceratitis Macleay, 1829, cujas larvas se desenvolvem no interior dos frutos, causando perdas que ultrapassam US$ 2 bilhões anuais globalmente (ZUCCHI; MALAVASI, 2004; GODOY; PACHECO; MALAVASI, 2011). No Rio Grande do Norte, esse impacto é estratégico, pois o estado é um dos maiores exportadores nacionais de frutas, dependendo do manejo desses dípteros para superar barreiras fitossanitárias (IBGE, 2024; ALUJA; MANGAN, 2008).

No entanto, o avanço do conhecimento sobre esses dípteros na matriz urbana ainda é insuficiente, visto que a tefritofauna brasileira permanece subamostrada em ecossistemas nativos e áreas urbanas, sendo muitas vezes negligenciada em favor de estudos focados exclusivamente em agroecossistemas (ARAÚJO et al., 2021; ZUCCHI; MORAES, 2023). Na cidade de Natal, RN, essa lacuna é acentuada, pois apesar da importância estratégica de suas unidades de conservação como refúgios de biodiversidade inseridos na malha urbana, a percepção da população local tende a ser limitada e associada majoritariamente a aspectos negativos, como incômodo e sujeira (COSTA-NETO, 2002).

Diante desse cenário, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de investigar a percepção dos natalenses acerca das moscas-das-frutas, uma vez que informações sobre o conhecimento etnozoológico em contextos urbanos ainda são escassas. Compreender como a população identifica esses insetos e percebe seus impactos é fundamental para identificar falhas na alfabetização científica e orientar práticas de controle doméstico. Assim, este estudo objetiva avaliar a percepção pública e o conhecimento etnozoológico sobre as moscas-das-frutas entre moradores de Natal, buscando diagnosticar o nível de informação sobre sua identificação, biologia e estratégias de manejo, a fim de fornecer

subsídios para futuras ações de divulgação científica e educação ambiental no cotidiano urbano.

Metodologia

ÁREA DE ESTUDO E DELINEAMENTO A PESQUISA

O estudo foi realizado na matriz urbana do município de Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte, entre os meses de setembro e novembro de 2025. A pesquisa caracteriza-se como um estudo descritivo, com abordagem quali-quantitativa, desenvolvido com o objetivo de investigar a percepção pública e o conhecimento etnozoológico da população acerca das moscas-das-frutas. A escolha da matriz urbana de Natal como área de estudo está relacionada à presença de extensas áreas verdes distribuídas pela cidade, incluindo as Zonas de Proteção Ambiental (ZPA's), além da ocorrência de árvores frutíferas em espaços públicos e privados, fatores que favorecem a interação entre a população e diferentes espécies de insetos. Dessa forma, o ambiente urbano constitui um cenário adequado para a investigação das relações estabelecidas entre os indivíduos e as moscas-das-frutas.

PROCEDIMENTOS DE COLETA

A coleta dos dados foi realizada por meio da aplicação de um questionário semiestruturado, elaborado na plataforma Google Forms. O questionário foi composto por dez perguntas, contendo questões fechadas e abertas, organizadas em quatro eixos principais: caracterização sociodemográfica, percepção pública, conhecimento sobre as moscas-das-frutas e estratégias de manejo. No eixo de percepção, foi incluída uma questão de identificação visual utilizando imagens de três dípteros distintos: a mosca-das-frutas nativa Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830), uma mosca-do-vinagre (Drosophila sp.) e uma mosca varejeira, com o objetivo de comparar o conhecimento declarado pelos participantes com a sua capacidade real de reconhecer o organismo estudado. A divulgação do questionário ocorreu por meio do Instagram pessoal da pesquisadora, de grupos vinculados à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e do aplicativo WhatsApp.

ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

Ao final do período de coleta, foram obtidas 385 respostas válidas. Este quantitativo foi estabelecido para garantir a representatividade estatística da amostra, correspondendo ao tamanho amostral necessário para um nível de confiança de 95% e uma margem de erro de 5% sobre a população urbana de Natal. Os dados coletados foram armazenados no Google Planilhas, ferramenta que também foi utilizada para a sistematização das informações e a elaboração dos gráficos. Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística descritiva, utilizando frequências absolutas e relativas. Para as respostas discursivas referentes às medidas de controle, os dados foram posteriormente agrupados em categorias temáticas, permitindo a identificação dos principais padrões de resposta e do conhecimento etnozoológico da população.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO E ABRANGÊNCIA DA PESQUISA

A pesquisa obteve um total de 385 respostas válidas, atingindo o quantitativo necessário para garantir a representatividade estatística da matriz urbana de Natal, com 95% de nível de confiança. A amostra apresentou uma diversidade geográfica significativa, abrangendo moradores de bairros como Candelária, Lagoa Nova, Pitimbú, Ponta Negra, Pajuçara, Redinha, Capim Macio e Neópolis, entre outros. Em termos de perfil, observou-se uma predominância de jovens na faixa etária de 18 a 25 anos e de indivíduos com Ensino Superior (completo ou incompleto), embora todos os níveis de escolaridade e faixas etárias acima de 18 anos estivessem representados.

PERCEPÇÃO GERAL E ASSOCIAÇÕES AO TERMO "MOSCA"

Ao serem solicitados a realizar uma associação livre com a palavra "mosca", a percepção negativa foi amplamente dominante. Aproximadamente 180 participantes associaram o inseto imediatamente a "Sujeira / Doenças", enquanto cerca de 130 indicaram "Incomodativo / Chato" (Figura 4). Termos neutros como "Inseto comum" foram citados por apenas 62 respondentes, e associações positivas relacionadas ao equilíbrio ecológico não foram registradas de forma espontânea.

CONHECIMENTO ETNOZOOLÓGICO E TESTE DE IDENTIFICAÇÃO VISUAL

Embora a maioria da amostra (cerca de 240 pessoas) tenha declarado conhecer as moscas-das-frutas previamente, os resultados do teste visual revelaram uma lacuna técnica (Figura 5). Ao serem confrontados com imagens de três dípteros (a praga alvo Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830), uma Drosophila sp. e uma mosca varejeira), os votos dividiram-se drasticamente entre a Opção 2 (correta) e a Opção 1, demonstrando que uma parcela significativa da população confunde a mosca-das-frutas com a mosca-do-vinagre (Figura 6).

INTERAÇÃO DIÁRIA E PRÁTICAS DE MANEJO

A interação com o grupo é frequente na capital: cerca de 220 respondentes confirmaram já ter tido contato com frutos infestados por larvas (o "bicho-da-goiaba") (Figura 7). No que tange ao manejo, as respostas discursivas mostraram uma forte dependência de métodos tradicionais. As medidas mais citadas incluíram o uso de inseticidas aerossóis domésticos, o descarte do fruto no lixo comum e "venenos comprados em feiras". Métodos de Manejo Integrado de Pragas (MIP), como o uso de armadilhas pet com atrativo alimentar proteico ou o controle biológico com parasitoides, foram citados quase exclusivamente por participantes com nível de pós-graduação.

DISCUSSÃO

Este estudo possui um caráter inédito ao focar na percepção pública dentro da matriz urbana de Natal, um cenário frequentemente negligenciado em favor de áreas de produção agrícola intensiva. A literatura destaca que, no Nordeste brasileiro, a fauna de Tephritidae permanece subamostrada em ecossistemas nativos, sendo muitas vezes "mascarada" pelo foco histórico em agroecossistemas. Os resultados obtidos em Natal confirmam que essa invisibilidade científica se traduz em uma lacuna de conhecimento popular: embora as moscas-das-frutas habitem quintais urbanos e áreas adjacentes às

Unidades de Conservação, elas não são reconhecidas como organismos distintos pela população local, que as confunde com dípteros sinantrópicos comuns.

A associação predominante das moscas a conceitos como "Sujeira" e "Doenças" revela uma visão utilitarista e negativa que ignora a vasta importância ecológica da ordem Diptera. Segundo STORK (2018), esses insetos correspondem a cerca de 15% da diversidade animal conhecida e são componentes vitais na ciclagem de matéria orgânica através da saprofagia e necrofagia, processos essenciais para a fertilidade do solo. Enquanto a ciência descreve dípteros (como as famílias Syrphidae e Bombyliidae) como polinizadores comparáveis às abelhas e reguladores de populações de outros invertebrados, o senso comum em Natal foca exclusivamente no incômodo. Essa discrepância evidencia que a percepção pública está distante da realidade biológica, onde a Diptera sustenta teias tróficas complexas e atua no equilíbrio ecossistêmico (COURTNEY et al., 2017).

A falha dos participantes em identificar corretamente a Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830), no teste visual fundamenta a existência de um acentuado Déficit Lineano no conhecimento etnozoológico urbano. Definido como a incerteza na identidade taxonômica de espécies e complexos crípticos, este déficit impede que a população compreenda o real impacto de pragas específicas (HORTAL et al., 2015). A confusão entre a mosca-das-frutas e a mosca-do-vinagre (Drosophila sp.) é particularmente preocupante, pois mascara um organismo que possui alta adaptabilidade a diversos hospedeiros e elevada frequência populacional em Natal (GODOY; PACHECO; MALAVASI, 2011).

O Rio Grande do Norte consolidou-se como um dos maiores exportadores nacionais de frutas frescas, um setor vital que depende intrinsecamente da superação de barreiras fitossanitárias (IBGE, 2024). Entretanto, os dados mostram que o natalense utiliza estratégias de manejo amadoras e majoritariamente químicas, como "venenos de feira" e inseticidas aerossóis.

Essa dependência química contrasta com os custos astronômicos do setor: globalmente, os prejuízos por tefritídeos ultrapassam US$ 2 bilhões anuais, e no Brasil, os custos de monitoramento variam entre US$ 200 milhões por ano (ZUCCHI; MALAVASI, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). A falta de conhecimento sobre o Manejo Integrado de Pragas (MIP) e o controle biológico na matriz urbana pode comprometer a manutenção do status de Área Livre de Praga (ALP), essencial para a exportação de produtos como o melão e a manga (ARAÚJO; FERNANDES, 2021).

Embora a amostra de 385 respostas seja estatisticamente robusta, a aplicação via questionário online gerou um viés demográfico para o público jovem (18-25 anos) com maior escolaridade. Para mitigar os Déficits Wallaceanos (distribuição geográfica) e Eltonianos (interações tróficas) na matriz urbana, sugere-se que trabalhos futuros adotem abordagens de "Ciência Cidadã", envolvendo a coleta física de larvas em diferentes bairros de Natal. Isso permitiria um refinamento taxonômico e ecológico que integra o conhecimento popular à vigilância fitossanitária ativa, transformando a percepção negativa em uma postura de conservação e manejo consciente da biodiversidade potiguar.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que, embora a interação entre os moradores de Natal e as moscas-das-frutas seja frequente — com aproximadamente 220 participantes

confirmando contato direto com o "bicho-da-goiaba" (Figura 7) —, existe uma desconexão crítica entre a convivência física e o conhecimento técnico-biológico sobre esses insetos. A percepção pública é marcadamente negativa, focada em conceitos de "sujeira" e "doenças" (Figura 4) , o que negligencia os serviços ecossistêmicos vitais desempenhados por dípteros, como a polinização e a ciclagem de matéria orgânica.

A pesquisa confirmou a presença de um acentuado Déficit Lineano na matriz urbana de Natal. A discrepância entre o conhecimento declarado e a falha na identificação visual — onde muitos confundiram a praga agrícola Anastrepha fraterculus com a mosca-do-vinagre (Figura 6) — revela que a tefritofauna permanece "invisível" para a população, apesar de sua onipresença em quintais e áreas próximas a Zonas de Proteção Ambiental (ZPAs).

Do ponto de vista socioeconômico, a prevalência do controle químico amador em detrimento de práticas de manejo sustentável representa um risco indireto à fruticultura do Rio Grande do Norte. Como o estado é um dos maiores exportadores de frutas frescas do Brasil e depende de rigorosas barreiras fitossanitárias, a falta de preparo da população urbana para identificar e manejar essas pragas de forma correta pode comprometer o status sanitário da região.

Por fim, este trabalho evidencia que a simples proximidade com a biodiversidade urbana não garante a alfabetização científica. Reconhece-se que o uso de questionários online gerou um viés demográfico, concentrando as respostas no público entre 18 e 25 anos. Portanto, é imperativo o fortalecimento de ações de divulgação científica e educação ambiental que transponham o meio acadêmico e cheguem ao cotidiano dos cidadãos. Sugere-se que pesquisas futuras utilizem métodos de "ciência cidadã" e coletas presenciais para mitigar os déficits de conhecimento e transformar a percepção negativa em uma postura de vigilância participativa e conservação da biodiversidade potiguar.

Referências

ALUJA, M.; MANGAN, R. L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host plant interactions: a critical review of its concept and certain implications and regional patterns. Annual Review of Entomology, v. 53, p. 473-500, 2008.

ARAÚJO, E. L. et al. Tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Brazilian Caatinga: diversity and host plants. Zootaxa, v. 4927, n. 3, p. 301-346, 2021.

ARAÚJO, E. L.; FERNANDES, E. C. Moscas-das-frutas, suas plantas hospedeiras e parasitóides no estado do Rio Grande do Norte. In: ZUCCHI, R. A.; UCHÔA, M. A.; CANAL, N. A. (org.). Moscas-das-frutas no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2010. p. 739-752.

ARAÚJO, E. L.; FERNANDES, M. S. Moscas-das-frutas no semiárido brasileiro. Revista Brasileira de Fruticultura, 2021.

BROWN, B. V. et al. Manual of Afrotropical Diptera. Volume 2. Pretoria: South African National Biodiversity Institute, 2018.

COSTA-NETO, E. M. A etnozoologia no Brasil: um panorama bibliográfico. Bioikos, Campinas, v. 14, n. 2, p. 73-81, 2000.

COURTNEY, G. W. et al. Biodiversity of Diptera. In: FOOTTIT, R. G.; ADLER, P. H. (Eds.). Insect Biodiversity: Science and Society. Oxford: Wiley-Blackwell, 2017.

GODOY, M. S.; PACHECO, W. S. M.; MALAVASI, A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em fruteiras comerciais e nativas. In: Bioecologia e Manejo de Moscas-das-Frutas. Brasília: Embrapa, 2011.

HORTAL, J. et al. Seven shortfalls that beset the knowledge of biodiversity. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, v. 46, p. 523-549, 2015.
IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal 2024. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.
LIMA, I. S.; MALAVASI, A. Host selection by Ceratitis capitata: field and laboratory studies. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1997.
MARINONI, R. C.; BARRIGA, H. R.; HELFER, H. H. Levantamento da fauna entomológica no estado do Paraná. Revista Brasileira de Zoologia, v. 18, supl. 1, p. 185-206, 2001.
MARSHALL, S. A. Flies: The Natural History and Diversity of Diptera. Richmond Hill: Firefly Books, 2012.
NATAL (Município). Zoneamento ambiental de Natal. Natal: Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo, 2008.
OLIVEIRA, A. S. et al. Impacto econômico das moscas-das-frutas na fruticultura brasileira. Circular Técnica Embrapa, 2013.
SKEVINGTON, J. H. et al. Field Guide to the Flower Flies of Northeastern North America. Princeton: Princeton University Press, 2019.
SMITH-CULLY, H. et al. Evolution and dispersal of Anastrepha (Diptera: Tephritidae) in the Neotropical region. Journal of Biogeography, 2007.
ZART, M.; FERNANDES, M. S.; BOTTON, M. Moscas-das-frutas: biologia e manejo. Circular Técnica Embrapa, Bento Gonçalves, 2009.
ZUCCHI, R. A. Fruit flies in Brazil. 2000.
ZUCCHI, R. A. (org.). Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000.
ZUCCHI, R. A.; MALAVASI, A. Manejo de moscas-das-frutas. In: Proteção de Plantas. São Paulo: USP, 2004.
ZUCCHI, R. A.; MORAES, R. C. B. Fruit flies in Brazil - Anastrepha species and their host plants. Journal of Natural History, 2023.

Anexos



Figura 1 - Imagem representativa da Anastrepha fraterculus contida no questionário.



Figura 2 - Imagem representativa de uma Drosophila sp. contida no questionário.



Figura 3 - Imagem representativa de uma Mosca varejeira contida no questionário.



Figura 4 - Percepção da população de moradores de Natal/RN sobre a palavra "mosca", demonstrando o estigma negativo vinculado majoritariamente a sujeira, doenças e incômodo.



Figura 5 - Nível de conhecimento declarado sobre Moscas-das-Frutas antes da aplicação do teste de identificação visual.



Figura 6 - Resultado do teste de percepção taxonômica: desempenho dos respondentes na identificação visual da mosca-das-frutas (Anastrepha fraterculus) em comparação a outros dipteros urbanos.



Figura 7 - Relato de experiência direta com larvas em frutos ("bicho-da-goiaba"), evidenciando a alta frequência do contato com a praga no cotidiano doméstico.



Figura 8 e 9 - Relação entre o gênero dos participantes e o conhecimento sobre a mosca-das-frutas (Anastrepha fraterculus): à esquerda, a percepção de reconhecimento da praga; à direita, o desempenho na identificação visual da espécie.



Figura 10 e 11 - Distribuição das respostas por nível de escolaridade: à esquerda, o nível de conhecimento declarado sobre a mosca-da-fruta; à direita, a precisão na identificação visual da espécie através da imagem.

CÓDIGO: SB1102

AUTOR: LUANA FERNANDA CAVALCANTE SUASSUNA

COAUTOR: ISABELA SILVA VIANA

COAUTOR: KARINNA VERISSIMO MEIRA TAVEIRA

COAUTOR: CYNTHIA MEIRA DE ALMEIDA GODOY

ORIENTADOR: RENATA VEIGA ANDERSEN CAVALCANTI

TÍTULO: Terapia Miofuncional Orofacial no Tônus e Mobilidade Orofacial em Pacientes com Intolerância Alimentar Pós-Bariátrica: análise preliminar

Resumo

Introdução: Indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica podem apresentar alterações no tônus e na mobilidade orofacial, impactando o sistema estomatognático. Objetivo: Avaliar mudanças no tônus e na mobilidade orofacial após Terapia Miofuncional Orofacial (TMO), comparando-as com orientações fonoaudiológicas. Métodos: Estudo piloto, longitudinal, quase-experimental e com grupo de comparação, com sete mulheres submetidas à cirurgia bariátrica, (média de 49) anos. Cinco participaram de dez sessões de TMO ao longo de dez semanas e duas receberam orientações fonoaudiológicas. O tônus e a mobilidade orofacial foram avaliados por meio da versão reduzida do protocolo MBGR. Resultados: No grupo submetido à TMO, observaram-se mudanças favoráveis na mobilidade de lábios (20%), língua (20%) e mandíbula (20%) e no tônus de lábios (60%), bochechas (60%) e língua (20%). Uma participante (20%) apresentou alteração desfavorável do tônus do mento. No grupo de comparação, uma das duas participantes (50%) apresentou mudança favorável no tônus de lábios e bochechas e na mobilidade de lábios. Conclusão: Foram observadas mudanças no tônus e na mobilidade orofacial após o período de acompanhamento, mais frequentes no grupo submetido à TMO. O tamanho amostral reduzido, o desequilíbrio entre os grupos e a ocorrência de mudanças também no grupo de comparação não permitem atribuir as mudanças observadas exclusivamente à intervenção. Portanto, os resultados devem ser considerados preliminares.

Palavras-chave: Cirurgia bariátrica. Terapia miofuncional orofacial.

TITLE: Orofacial Myofunctional Therapy and Orofacial Muscle Tone and Mobility in Patients with Post-Bariatric Food Intolerance: A Preliminary Analysis

Abstract

Introduction: Individuals undergoing bariatric surgery may present changes in orofacial muscle tone and mobility, affecting the stomatognathic system. Objective: To evaluate changes in orofacial muscle tone and mobility following Orofacial Myofunctional Therapy (OMT), compared with speech-language therapy guidance. Methods: This pilot, longitudinal, quasi-experimental study with a comparison group included seven women who had undergone bariatric surgery (mean age: 49 years). Five underwent ten OMT sessions over ten weeks, while two received speech-language therapy guidance. Orofacial muscle tone and mobility were assessed using the reduced MBGR protocol. Results: In the OMT group, favorable changes occurred in lip (20%), tongue (20%), and mandibular (20%) mobility and in lip (60%), cheek (60%), and tongue (20%) muscle tone. One participant (20%) showed an unfavorable change in chin muscle tone. In the comparison group, one participant (50%) showed favorable changes in lip and cheek muscle tone and lip mobility. Conclusion: Changes in orofacial muscle tone and mobility were more frequent in the OMT group. However, the small sample, group imbalance, and changes also observed in the comparison group prevent attributing these findings exclusively to the intervention. Therefore, the results are preliminary.

Keywords: Bariatric surgery; Orofacial myofunctional therapy.

Introdução

Indivíduos com obesidade podem apresentar alterações funcionais e estruturais no sistema estomatognático relacionadas ao acúmulo de gordura nas estruturas orofaciais (Castro, 2022). Entre os achados descritos na literatura, incluem-se alterações na postura e na aparência de lábios, mandíbula, bochechas, língua e palato duro, bem como comprometimentos relacionados à mobilidade dessas estruturas (Gualdrón-Bobadilla, 2022). Nesse contexto, a cirurgia metabólica e bariátrica é uma das estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento da obesidade, particularmente da obesidade grave, apresentando evidências robustas de perda ponderal sustentada, melhora das comorbidades, redução de mortalidade e aumento da expectativa de vida, principalmente a longo prazo (Elsenberg,2022 ;Carlsson, 2020; Aminian,2021). Embora a cirurgia esteja associada à perda de peso significativa, ainda são limitadas as evidências acerca da evolução das alterações miofuncionais orofaciais após o procedimento e de sua possível relação com as modificações na composição corporal decorrentes do emagrecimento. Soma-se a isso a escassez de estudos voltados à caracterização do sistema estomatognático de indivíduos no período pós-operatório, especialmente a longo prazo. Gualdrón-Bobadilla et. al. (2022) apontam que alterações do sistema estomatognático e dificuldades relacionadas à mastigação podem estar presentes em indivíduos com obesidade e persistir após a cirurgia bariátrica. Entre os aspectos descritos estão condições dentárias, alterações do padrão mastigatório, redução da força de mordida e modificações do tônus de estruturas orofaciais. Considerando que o desempenho das funções estomatognáticas depende da interação entre diferentes estruturas e componentes funcionais, a investigação do tônus e da mobilidade orofacial pode contribuir para a compreensão das necessidades fonoaudiológicas dessa população. Nesse âmbito, a Terapia Miofuncional Orofacial (TMO) constitui uma abordagem voltada à adequação das condições musculares e funcionais do sistema estomatognático, por meio de estratégias terapêuticas definidas a partir das alterações identificadas na avaliação. Entre os aspectos que podem ser contemplados estão o tônus, a mobilidade e a coordenação das estruturas orofaciais, bem como o treino funcional.

Rossi et al. (2019) observaram mudanças na mastigação e na deglutição bem como redução de sintomas de intolerância alimentar após intervenção fonoaudiológica em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica. Nesse cenário, a Resolução CFFa nº 717/2023 regulamentou a atuação fonoaudiológica em equipes multiprofissionais no tratamento clínico da obesidade e na cirurgia bariátrica. A produção de evidências científicas que subsidiem essa atuação é, portanto, relevante. Diante do exposto, esta pesquisa busca ampliar o conhecimento acerca das alterações miofuncionais orofaciais observadas em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica e investigar as mudanças no tônus e na mobilidade orofacial após um programa de Terapia Miofuncional Orofacial (TMO), em comparação com orientações fonoaudiológicas. Considerando o caráter piloto do estudo, partiu-se da hipótese de que mudanças favoráveis nesses parâmetros seriam mais frequentes entre as participantes submetidas à TMO.

Metodologia

Trata-se de um estudo piloto, longitudinal e quase-experimental, com grupo de comparação, realizado entre os meses de julho e outubro de 2025. Participaram pacientes recrutadas no projeto ‘’Intervenção terapêutica miofuncional orofacial em pacientes pós-cirurgia bariátrica’’. Adotou-se uma amostragem não probabilística por conveniência, composta por pacientes encaminhadas pelo ambulatório de cirurgia bariátrica do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) à Clínica Escola de Fonoaudiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Onofre Lopes, Parecer nº 7.698.819, de 09/07/2025. Todas as participantes foram previamente esclarecidas quanto aos objetivos e procedimentos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram considerados critérios de inclusão: ter sido submetida à cirurgia bariátrica; ter realizado avaliação fonoaudiológica prévia no ambulatório de origem e apresentar queixa de intolerância alimentar e alterações de mastigação. Foram excluídas pacientes com alterações neurológicas, edentulismo sem reabilitação oral ou uso de próteses dentárias desajustadas. Inicialmente, 22 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica foram avaliados para elegibilidade. Após a aplicação dos critérios de elegibilidade e as recusas em participar, 10 foram selecionados e distribuídos em dois grupos de forma aleatória via randon.org, cinco no Grupo Intervenção (GI) e cinco no Grupo Comparação (GC). Porém, no decorrer da pesquisa, 3 do GC não concluíram o estudo. Desta forma, a amostra final foi composta por sete mulheres, submetidas à cirurgia bariátrica entre 2023 e 2025 e com, no mínimo, três meses de pós-operatório, sendo cinco do GI e duas do GC). O tônus e a mobilidade orofacial foram avaliados por meio do Exame Clínico Miofuncional Orofacial - Versão reduzida (MBGR)(Pereira, 2023). O protocolo MBGR utiliza escores, a mobilidade é pontuada por estrutura: língua e lábios de zero a nove pontos; véu palatino de zero a quatro pontos; e mandíbula de zero a seis pontos. O escore zero indica ausência de alteração, e quanto maior a pontuação, maior a alteração de mobilidade observada. Na avaliação do tônus observa as estruturas de lábios, língua, bochechas e mento que podem ser classificadas como: tônus normal (0 pontos), tônus aumentado (1 ponto)e tônus diminuído (1 ponto), . Sendo zero o pior resultado e o melhor seis. As participantes foram avaliadas em dois momentos, antes e após um período de dez semanas. Durante esse período, o GI participou de dez sessões individuais de TMO, com duração aproximada de 50 minutos, utilizando programa específico para indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica (Viana, 2025). O GC recebeu

uma sessão de orientações fonoaudiológicas e a terapeuta estava disponível durante as semanas para esclarecer dúvidas via whatsapp. O programa aplicado ao GI foi composto por exercícios isométricos com o objetivo de fortalecer a musculatura de lábios, língua e bochechas, exercícios isotônicos para ampliar a mobilidade de lábios, bochechas e língua, massagens com o propósito de reduzir a tensão muscular e melhorar a circulação sanguínea na região e atividades de conscientização da mastigação e da deglutição (quadro 1). Durante o período da pesquisa todas as participantes utilizavam próteses dentárias parciais consideradas bem ajustadas pelo setor de Odontologia do ambulatório de cirurgia bariátrica. Os dados foram analisados de forma descritiva. Para a caracterização da amostra, foram utilizadas medidas de tendência central e dispersão. As alterações no tônus e na mobilidade orofacial foram descritas individualmente e por grupo, considerando as avaliações realizadas antes e após o período de acompanhamento.

Resultados e Discussões

A amostra foi integralmente composta por mulheres. Embora a obesidade afeta ambos os sexos, estudos prévios descrevem maior frequência de mulheres submetidas à cirurgia bariátrica, possivelmente relacionada a diferenças na procura pelo tratamento e a fatores associados à percepção da saúde e da imagem corporal (Carvalho, 2019; Da Silveira, 2026; Schlottmann, 2022). Entretanto, considerando o reduzido tamanho amostral do presente estudo, a composição exclusivamente feminina deve ser interpretada como característica da amostra e não como representação da população submetida ao procedimento. A idade média das participantes foi de 49 anos (DP ± 7,3), variando de 39 a 62 anos. No GI, as idades variaram entre 42 e 62 anos e, no GC, entre 39 e 51 (Quadro 1). A média de idade foi superior às médias de idade descritas no estudo de Silva et al. (2023). Essa diferença deve ser interpretada com cautela, principalmente em razão do reduzido número de participantes e da ausência de representatividade populacional da amostra. Em relação ao tempo de pós-operatório, o GI apresentou maior heterogeneidade, com participantes avaliadas entre três meses e dois anos após a cirurgia, enquanto as duas participantes do GC apresentavam 15 meses de pós-operatório (Quadro 2). Todas já haviam concluído a progressão da dieta e encontravam-se aptas à realização das atividades propostas. Na avaliação inicial da mobilidade (quadro 3), as estruturas com maior frequência de alterações foram mandíbula (85,7%), língua (71,4%) e lábios (42,9%) (Tabelas 3 e 4). Não foram observadas alterações na mobilidade do véu palatino. Esses achados indicam a presença de alterações na mobilidade orofacial entre as participantes avaliadas no período pós-operatório. Resultados semelhantes foram descritos por Silva et al. (2023) que observaram maior frequência de alterações na mobilidade mandibular em indivíduos adultos com obesidade, seguida de lábios, língua e bochechas. Alterações de mobilidade de lábios, língua, mandíbula e bochechas em indivíduos com obesidade também foram observadas por Rocha et. al. (2019). Embora as populações avaliadas nesses estudos sejam distintas da amostra do presente estudo, os achados reforçam a importância de considerar a mobilidade das estruturas orofaciais na avaliação miofuncional. O programa terapêutico contemplou atividades direcionadas à mobilidade de lábios, língua e bochechas, sem exercícios exclusivos para a mobilidade mandibular. Na avaliação inicial, seis das sete participantes apresentaram algum grau de alteração mandibular, enquanto apenas uma participante do GI apresentou redução do escore de alteração na reavaliação. A ausência de exercícios para a mandíbula deve ser considerada na

interpretação desse achado; contudo, não é possível estabelecer relação entre a ausência desses exercícios e a manutenção das alterações observadas. Fatores individuais, clínicos e relacionados ao próprio processo de adaptação pós-operatória também podem ter influenciado os resultados. Na avaliação final (quadro 3), observaram-se mudanças favoráveis na mobilidade em três participantes do GI: P1 apresentou redução do escore de língua de 3 para 0; P3, redução do escore de lábios de 1 para 0; e P4, redução do escore de mandíbula de 1 para 0. No GC, P6 apresentou redução do escore de lábios de 1 para 0, enquanto os demais parâmetros permaneceram inalterados. Assim, mudanças favoráveis foram observadas em três das cinco participantes do GI e em uma das duas participantes do GC. Considerando o reduzido número de participantes, esses resultados devem ser interpretados descritivamente, sem inferência de diferença entre os grupos. A mobilidade de lábios e língua participa das funções relacionadas à mastigação e à deglutição (Macedo, 2025). Entretanto, neste estudo, não foi investigada a relação entre as mudanças nos escores de mobilidade e possíveis mudanças no desempenho funcional. Ademais, a redução observada no escore de mobilidade mandibular não pode ser atribuída aos exercícios propostos, uma vez que não foram realizados exercícios específicos para essa estrutura e o delineamento não permite estabelecer essa relação. Na avaliação inicial do tônus orofacial, observou-se hipotonia de bochechas (71,4%), hipotonia de lábios (57,1%) e de língua (14,3%), enquanto a hipertonia de mento foi identificada em 14,3% das participantes. Figueiredo et al. (2014) também descreveram alterações de tônus em indivíduos com obesidade: hipotonia de lábio (72,2%), de língua (83,3%) e de bochecha (55,5%). Os achados do presente estudo apresentam características semelhantes às descritas na literatura que descreve alterações no sistema estomatognático nessa população, incluindo hipotonia lingual e de bochechas, hipotonia labial e alterações no vedamento labial, além de repercussões sobre funções como mastigação e deglutição (Gualdrón-Bobadilla et al., 2022). Contudo, por se tratar de uma amostra pequena e sem avaliação pré-operatória, não é possível determinar se essas alterações estavam presentes antes da cirurgia ou se sofreram modificações após o procedimento. Na avaliação final, foram observadas mudanças favoráveis no tônus de diferentes estruturas. No GI, três participantes apresentaram adequação do tônus de lábios e três, de bochechas; uma participante apresentou adequação do tônus de língua. Em contrapartida, uma participante passou a apresentar hipertonia de mento. No GC, uma participante apresentou adequação do tônus de lábios e bochechas, enquanto os demais parâmetros permaneceram inalterados. Dessa forma, descritivamente, observou-se maior número de mudanças favoráveis no GI. Entretanto, a ocorrência de mudança também no GC e o reduzido número de participantes não permitem estabelecer diferenças entre os grupos nem atribuir as modificações observadas à TMO. A distribuição das mudanças observadas sugere uma tendência de maior frequência de adequação do tônus no GI, particularmente em lábios e bochechas. Esse achado é compatível com uma possível contribuição das estratégias miofuncionais adotadas, mas deve ser interpretado de forma exploratória, sem inferência de eficácia ou causalidade. Considerando o caráter piloto e descritivo deste estudo, os achados indicam mudanças no tônus e mobilidade de algumas estruturas durante o período de acompanhamento, particularmente em lábios e bochechas entre as participantes do GI. Entretanto, esses resultados devem ser interpretados de forma exploratória, sem inferência de eficácia ou causalidade. A escassez de estudos sobre tônus e mobilidade orofacial após cirurgia bariátrica e sobre intervenções miofuncionais nessa população limita a comparação direta dos achados com a literatura disponível. Assim, os resultados deste estudo devem ser compreendidos principalmente como dados exploratórios para subsidiar pesquisas posteriores. Entre as limitações do estudo, destacam-se o reduzido tamanho amostral, o

desequilíbrio numérico entre os grupos, a heterogeneidade do tempo de pós-operatório e a ocorrência de mudanças também no grupo de comparação. Além disso, as avaliações inicial e final e a intervenção terapêutica foram realizadas pela mesma pesquisadora, que tinha conhecimento da distribuição das participantes entre os grupos, o que pode ter introduzido viés de mensuração dos desfechos. Esses aspectos limitam a atribuição das mudanças observadas exclusivamente à intervenção terapêutica e a generalização dos achados. Estudos futuros devem incluir amostras maiores, grupos mais equilibrados, avaliadores independentes, maior homogeneidade quanto ao tempo de pós-operatório e acompanhamento longitudinal, a fim de investigar as possíveis mudanças no tônus e na mobilidade orofacial após TMO nessa população.

Conclusão

Os achados deste estudo piloto mostraram mudanças favoráveis no tônus e na mobilidade orofacial após o período de acompanhamento, observadas com maior frequência entre as participantes submetidas à Terapia Miofuncional Orofacial. Destaca-se, ainda, elevada frequência de alterações na mobilidade mandibular na avaliação inicial e sua limitada modificação ao longo do acompanhamento. Entretanto, considerando as limitações metodológicas do estudo, não é possível atribuir exclusivamente à TMO as mudanças observadas, devendo os resultados ser interpretados como preliminares e exploratórios. Dessa forma, os achados apontam para a necessidade de estudos com maior rigor metodológico que investiguem as mudanças no tônus e na mobilidade orofacial após a TMO em indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica, incluindo maior atenção à mobilidade mandibular.

Referências

AMINIAN, A. et al. Reduction in long-term mortality after sleeve gastrectomy and gastric bypass compared to nonsurgical patients with severe obesity. Annals of Surgery, 2021. CARLSSON, L. M. S. et al. Life expectancy after bariatric surgery in the Swedish Obese Subjects study. New England Journal of Medicine, v. 383, n. 16, p. 1535-1543, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002449. CALCATERRA, Valeria et al. Mastication and oral myofunctional status in excess weight children and adolescents: A cross-sectional observational study. Journal of Oral Rehabilitation, v. 51, n. 11, p. 2345-2353, 2024. CARVALHO, Adriane da Silva; ROSA, Roger dos Santos. Cirurgias bariátricas realizadas pelo Sistema Único de Saúde no período 2010-2016: estudo descritivo das hospitalizações no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 28, p. e2018260, 2019 CASTRO, Mariana Cristina Zanin et al. Oral motor function in obesity. Journal of Oral Rehabilitation, v. 49, n. 5, p. 529-534, 2022. COURCOULAS, Anita P.; DAIGLE, Christopher R.; ARTERBURN, David E. Long term outcomes of metabolic/bariatric surgery in adults. BMJ, v. 383, 2023. DA SILVEIRA SMANIOTTO, Marcos Vinícius et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DOS PACIENTES ENCAMINHADOS PARA A CIRURGIA BARIÁTRICA EM UM MUNICÍPIO DO MEIO-OESTE CATARINENSE. Psicologia e Saúde em debate, v. 12, n. 1, p. 258-276, 2026. DE FIGUEIREDO, Adriana Bueno et al. The masticatory system of the obese: Clinical and electromyographic evaluation. International Journal of Orofacial Myology and Myofunctional Therapy, v. 40, n. 1, p. 31-41, 2014.

EISENBERG, D. et al. 2022 American Society for Metabolic and Bariatric Surgery (ASMBS) and International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders (IFSO): Indications for metabolic and bariatric surgery. Surgery for Obesity and Related Diseases, v. 18, n. 12, p. 1345-1356, 2022. DOI: 10.1016/j.soard.2022.08.013. GUALDRÓN-BOBADILLA, Gerson Fabián et al. Stomatognathic system changes in obese patients undergoing bariatric surgery: a systematic review. Journal of personalized Medicine, v. 12, n. 10, p. 1541, 2022. LOMACHINSKY, Maria da Conceição Queiroz et al. Translation and cross cultural adaptation of the questionnaire “Quality of Alimentation” for brazilian portuguese. In: CoDAS. Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia, 2024. p. e20230168 MACEDO, Ana Karoliny Pizati de et al. Relação entre a mobilidade orofacial ea gravidade dos resíduos faríngeos na disfagia orofaríngea em indivíduos com doença de Parkinson. Audiology-Communication Research, v. 30, p. e3028, 2025. PEREIRA, Asenate Soares de Matos. Versão reduzida do protocolo de avaliação miofuncional orofacial MBGR. 2023. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2023. ROCHA, Ana Cláudia Andrade; CONCEIÇÃO, Natália Oliveira de Souza; TONI, Laura Davison Mangilli. Mastigação e deglutição em indivíduos com obesidade indicados à realização de cirurgia bariátrica/gastroplastia – estudo piloto. Revista CEFAC, v. 21, n. 5, e8519, 2019. ROSSI, Débora Cardoso et al. Improvement in food intolerance resulting from Roux-en-Y gastric bypass after speech therapy intervention in chewing. Obesity Surgery, v. 29, n. 10, p. 3195-3201, 2019. SCHLOTTMANN, Francisco et al. Gender disparities in bariatric surgery among African Americans. Obesity Surgery, v. 32, n. 8, p. 2820-2822, 2022. SILVA, LYZ BEZERRA et al. Registro nacional de dados em cirurgia bariátrica-estudo piloto. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 50, p. e20233382, 2023 SOUZA, Noemia Caroline de; GUEDES, Zelita Caldeira Ferreira. Mastigação e deglutição de crianças e adolescentes obesos. Revista CEFAC, v. 18, n. 6, p. 1340-1347, 2016. VIANA, Isabela Silva. Intervenção miofuncional orofacial no período pós-cirurgia bariátrica: desenvolvimento e avaliação inicial de um estudo piloto com comparação. 2025. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fonoaudiologia) – Curso de Fonoaudiologia, Departamento de Fonoaudiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

Anexos



QUADRO 1 Caracterização da amostra por idade



QUADRO 2 Caracterização do tempo de pós-operatório (em meses)



QUADRO 3 - Caracterização da avaliação de mobilidade através dos escores do MBGR na avaliação inicial e final.



QUADRO 4 Caracterização da avaliação de tônus através dos escores do MBGR na avaliação inicial e final.

CÓDIGO: SB1104

AUTOR: CLARISSA CIBELLY OLIVEIRA DA COSTA

ORIENTADOR: ALICE DE MORAES CALVENTE

TÍTULO: Ecologia funcional e síndromes de dispersão em faixas amostrais do PPBio na FLONA de Nísia Floresta

Resumo

A dispersão de sementes constitui um processo fundamental para a dinâmica e a regeneração das comunidades vegetais, influenciando o estabelecimento de novos indivíduos e a manutenção da diversidade. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as síndromes de dispersão das espécies arbóreas registradas nas faixas sensíveis de cinco parcelas do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), na Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLONA de Nísia Floresta), Rio Grande do Norte. Os indivíduos arbóreos foram identificados e posteriormente classificados quanto à síndrome de dispersão, com base em informações obtidas por meio de pesquisa bibliográfica. Foram analisados 546 registros. Destes, 397 (72,71%) foram classificados como zoocóricos, 30 (5,49%) como anemocóricos, cinco (0,92%) como autocóricos e cinco (0,92%) apresentaram classificação combinada autocórica/anemocórica. Para 109 registros (19,96%), a síndrome permaneceu como NA. A predominância da zoocoria ocorreu em todas as parcelas analisadas, evidenciando a importância potencial da fauna na dinâmica de dispersão da comunidade vegetal estudada. Os resultados ampliam as informações disponíveis sobre atributos funcionais da vegetação da FLONA de Nísia Floresta e fornecem uma base para estudos posteriores sobre regeneração e interações ecológicas.

Palavras-chave: dispersão de sementes; zoocoria; Mata Atlântica; PPBio

TITLE: Functional ecology and dispersal syndromes in PPBio sampling transects at the Nísia Floresta National Forest

Abstract

Seed dispersal is a fundamental process for the dynamics and regeneration of plant communities, influencing the establishment of new individuals and the maintenance of diversity. This study aimed to characterize the dispersal syndromes of tree species recorded in the sensitive strips of five plots of the Biodiversity Research Program (PPBio) in the Nísia Floresta National Forest, Rio Grande do Norte, Brazil. Tree individuals were identified and subsequently classified according to their dispersal syndrome based on information obtained through a literature review. A total of 546 records were analyzed. Of these, 397 (72.71%) were classified as zoochorous, 30 (5.49%) as anemochorous, five (0.92%) as autochorous, and five (0.92%) showed a combined autochorous/anemochorous classification. For 109 records (19.96%), the syndrome remained unclassified (NA). Zoochory predominated in all analyzed plots, highlighting the potential importance of fauna in the dispersal dynamics of the studied plant community. The results expand the available information on the functional attributes of the vegetation in the Nísia Floresta National Forest and provide a basis for future studies on regeneration and ecological interactions.

Keywords: seed dispersal; zoochory; Atlantic Forest; PPBio

Introdução

A Mata Atlântica é reconhecida como um dos principais hotspots mundiais de biodiversidade, apresentando elevada riqueza biológica e uma complexa rede de interações ecológicas. Ao mesmo tempo, encontra-se entre os biomas mais ameaçados, principalmente em decorrência da fragmentação e da transformação de seus habitats naturais (Myers et al., 2000; Tabarelli, Peres & Melo, 2012). Nesse contexto, o conhecimento dos processos que participam da manutenção e regeneração de seus remanescentes é fundamental para subsidiar estratégias de conservação.

No litoral do Rio Grande do Norte, a Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLONA de Nísia Floresta) constitui um importante remanescente de Mata Atlântica, apresentando vegetação nativa associada à mata estacional semidecidual e à vegetação de restinga e tabuleiro, além de áreas em regeneração decorrentes de antigos plantios florestais. A diversidade de ambientes e o histórico de uso da área tornam relevante o acompanhamento da composição vegetal e de características ecológicas das espécies presentes.

A ecologia funcional oferece ferramentas para compreender o papel desempenhado pelas espécies nos ecossistemas a partir da análise de seus atributos funcionais. Esses atributos podem contribuir para a interpretação de processos relacionados à estrutura das comunidades, à regeneração e ao funcionamento dos ecossistemas (Lavorel & Garnier, 2002; Violle et al., 2007; Garnier et al., 2015).

Entre esses atributos, as síndromes de dispersão representam diferentes estratégias pelas quais os diásporos são transportados para longe da planta de origem. Na zoocoria, esse transporte envolve animais; na anemocoria, ocorre principalmente pela ação do vento; enquanto na autocoria a própria planta participa diretamente da dispersão de seus

propágulos. A ocorrência e a frequência dessas estratégias em uma comunidade podem fornecer informações importantes sobre sua dinâmica ecológica.

A dispersão também está diretamente relacionada ao recrutamento de novos indivíduos, à ocupação de diferentes locais e à continuidade dos processos de regeneração. Dessa maneira, conhecer as estratégias apresentadas pelas espécies de um remanescente florestal permite ampliar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos em sua manutenção.

O Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio) utiliza protocolos padronizados de amostragem que possibilitam a produção e integração de informações sobre biodiversidade em diferentes escalas (Costa & Magnusson, 2010). Na FLONA de Nísia Floresta, as parcelas permanentes constituem uma oportunidade para acompanhar características estruturais e funcionais da vegetação ao longo do tempo.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar as síndromes de dispersão das espécies arbóreas registradas nas faixas sensíveis das parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta.

Metodologia

O estudo foi desenvolvido na Floresta Nacional de Nísia Floresta (FLONA de Nísia Floresta), localizada no estado do Rio Grande do Norte. A unidade representa um remanescente de Mata Atlântica no litoral potiguar, contendo áreas de vegetação nativa e áreas em processo de regeneração relacionadas ao histórico de uso e à presença de antigos plantios florestais.

A amostragem foi vinculada ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), que emprega protocolos padronizados com o objetivo de permitir a integração e comparação de dados de biodiversidade em diferentes escalas espaciais e temporais (Costa & Magnusson, 2010). Foram consideradas cinco parcelas permanentes, cada uma com dimensões de 40 × 250 m. No interior de cada parcela, o levantamento concentrou-se em uma subfaixa central de 1 × 250 m, denominada faixa sensível.

Nas faixas sensíveis, foram registrados os indivíduos arbóreos com Diâmetro à Altura do Peito (DAP) > 1 cm, obtendo-se seus dados estruturais (como altura e DAP) e a identificação taxonômica (família e espécie), sempre que possível. O banco de dados final reuniu as informações de ocorrência por parcela e a taxonomia de cada indivíduo. A partir dessa base, desenvolveu-se a caracterização das síndromes de dispersão, etapa realizada exclusivamente para os táxons com identificação botânica confirmada.

Para cada táxon registrado, realizou-se uma busca individual na literatura científica a fim de levantar informações sobre o mecanismo de dispersão de seus diásporos. A partir dessa pesquisa espécie a espécie, elaborou-se uma tabela de referência contendo a taxonomia e a síndrome de dispersão correspondente. Em seguida, essa matriz foi

associada à base geral, permitindo classificar os indivíduos amostrados em suas respectivas categorias ecológicas.

Os registros foram classificados nas categorias zoocórica, quando a dispersão ocorre por intermédio de animais; anemocórica, quando o vento constitui o agente de dispersão; e autocórica, quando a dispersão ocorre por mecanismos relacionados à própria planta. Quando a literatura indicou mais de um mecanismo para a mesma espécie, a classificação combinada foi mantida (ex.: a inclusão do Eucalipto na categoria autocórica/anemocórica).

Quando não foi possível atribuir uma síndrome a partir das informações levantadas, o registro foi mantido como "NA", evitando inferir uma estratégia de dispersão sem suporte na base utilizada. Essa categoria englobou também 30 indivíduos que não possuíam identificação taxonômica em nível de espécie, incluindo indivíduos mortos, indeterminados ou identificados apenas em nível de gênero.

Foram calculadas as frequências absolutas e relativas das categorias de dispersão para o conjunto total (n = 546 indivíduos) e individualmente por parcela. A análise foi predominantemente descritiva, identificando a representação das estratégias, os padrões entre parcelas e as espécies com maior contribuição numérica em cada categoria.

Resultados e Discussões

A base final analisada reuniu 546 registros, distribuídos entre cinco parcelas da faixa sensível. A caracterização das síndromes de dispersão apresentou uma distribuição desigual entre as categorias (Figura 1). Do total analisado, 397 indivíduos foram associados à zoocoria, correspondendo a 72,71% da amostragem. As categorias autocórica e autocórica/anemocórica apresentaram participação de somente cinco indivíduos cada (0,92%). A síndrome anemocórica esteve presente em 30 registros, representando 5,49% do total. Para 109 registros (19,96%), a síndrome de dispersão permaneceu sem classificação definida (NA). A ausência da classificação ocorreu devido à falta de identificação taxonômica completa (indivíduos mortos, indeterminados ou identificados apenas em nível de gênero) em 30 indivíduos. Para os demais 79 indivíduos, embora houvesse identificação em nível de espécie (por exemplo Miconia serialis e Pogonophora schomburgkiana), as informações sobre seus mecanismos de dispersão não foram encontradas na literatura consultada.

A prevalência da zoocória (72,7% da amostragem) evidencia na comunidade estudada, o padrão mais marcante, indicando a importância das interações planta-animal, para a dispersão de diásporos, recrutamento e regeneração da FLONA. A dominância dessa síndrome é observada não só como um evento isolado, mas sim a abundância de espécies-chave e a diversidade das famílias botânicas envolvidas.

Entre as espécies zoocóricas mais abundantes (Figura 2), destacaram-se Leptobalanus octandrus (n = 62), Cordiera sessilis (n = 52), Psidium brownianum (n = 33), Myrcia decorticans (n = 22), Tapirira guianensis (n = 22) e Myrcia bergiana (n = 21). A família Myrtaceae apresentou uma contribuição substancial para esse cenário, com um conjunto expressivo de espécies dos gêneros Psidium, Myrcia e Eugenia (e.g., P. brownianum, M. decorticans, M. bergiana, M. multiflora, E. luschnathiana e E. candolleana). A zoocoria está amplamente distribuída em outras famílias como Chrysobalanaceae, Rubiaceae , Burseraceae além de Anacardiaceae, Sapindaceae e Malpighiaceae (Da Silva et al., 2021).

A anemocoria apresentou uma menor representatividade na comunidade, totalizando 30 indivíduos (5,4% do total). A síndrome foi representada predominantemente pela espécie Himatanthus bracteatus (n = 15), seguida por Apuleia leiocarpa e outros táxons de menor abundância.

Embora com baixa representação, a presença da anemocoria evidencia a coexistência de diferentes estratégias funcionais na comunidade. Essa diversidade de mecanismos, reflete adaptações a microhabitats distintos, garantindo vias complementares de regeneração, reduzindo a dependência exclusiva da fauna para restauração do componente arbóreo (Howe & Smallwood, 1982; Yamamoto et al., 2007). Na Mata Atlântica, a predominância de espécies zoocóricas associada a uma menor fração anemocórica é um padrão amplamente documentado para formações florestais tropicais úmidas (Tabarelli & Peres, 2002; Almeida-Neto et al., 2008).

A autocoria e a categoria combinada (autocórica/anemocórica) apresentaram baixa participação na comunidade, com apenas cinco indivíduos cada (0,92% da amostragem total). A ocorrência da categoria mista esteve associada exclusivamente a espécimes do gênero Eucalyptus (e.g., Eucalyptus spp.) o que reflete o histórico de uso e a presença de plantios exóticos na unidade. Essa baixa representatividade de mecanismos abióticos diretos e de automovimento reforça a assimetria no uso dos vetores de dispersão nessa formação florestal (Kinoshita et al., 2006; Tabarelli & Peres, 2002).

A predominância da zoocoria se manteve consistente ao longo de todas as parcelas amostradas (Figura 3), reforçando o caráter homogêneo desse padrão na comunidade. A parcela 2 se destacou com a maior abundância absoluta de indivíduos zoocóricos (n = 94), por outro lado a parcela 4 apresentou a menor frequência dessa categoria (n = 56). Estratégias como a autocoria estiveram restritas apenas à parcela 4 (n =5).

Embora tenham ocorrido diferenças na composição das categorias entre as parcelas, a zoocoria foi a estratégia mais numerosa em todas as cinco áreas amostradas. Esse resultado é particularmente importante porque demonstra que a predominância observada no conjunto geral não resulta apenas de uma concentração localizada de indivíduos zoocóricos em uma única parcela. O padrão se repete espacialmente ao longo das faixas analisadas.

A parcela 1 apresentou maior representação de anemocoria, com 18 indivíduos, enquanto na parcela 4 nenhum registro foi classificado exclusivamente como anemocórico. Por outro lado, os cinco indivíduos classificados exclusivamente como autocóricos ocorreram na parcela 4. Essas diferenças mostram que, apesar do domínio geral da zoocoria, existe heterogeneidade na representação das estratégias menos frequentes.

Os indivíduos sem síndrome definida (categoria NA) somaram 109 dos 546 registros (19,96% da amostragem). Essa condição abrangeu espécies com dados de literatura insuficientes para a atribuição de síndrome, como por exemplo a espécie Miconia serialis (n = 22), Guapira sp. e Ouratea sp., além de indivíduos sem identificação taxonômica no nível específico. Se forem considerados somente os 437 registros para os quais foi atribuída alguma síndrome, os 397 zoocóricos correspondem a aproximadamente 90,85% dos registros classificados. Dessa forma, independentemente da inclusão ou exclusão dos NA no denominador, a zoocoria permanece amplamente dominante.

De modo geral, os resultados demonstram uma clara predominância da zoocoria na comunidade arbórea analisada, padrão observado tanto no conjunto total quanto individualmente entre as parcelas. Essa elevada representatividade evidencia a importância potencial das interações entre plantas e animais nos processos de dispersão e regeneração da vegetação da FLONA de Nísia Floresta. Embora a caracterização das síndromes não permita identificar diretamente os animais responsáveis pela dispersão, os dados obtidos constituem uma base funcional importante para o monitoramento da área e para estudos futuros sobre regeneração e interações ecológicas.

Conclusão

O componente arbóreo das parcelas amostradas nas faixas sensíveis do PPBio na FLONA de Nísia Floresta apresenta forte dependência da zoocoria, como principal mecanismo de dispersão de diásporos, padrão que se manteve homogêneo nas áreas analisadas. Além disso, as síndromes abióticas (anemocoria e autocoria) desempenham papel secundário no estrato avaliado, estando associadas a micro-hábitats específicos ou à presença de espécies exóticas.

A predominância da zoocoria evidencia a relevância da fauna silvestre na manutenção dos processos de regeneração de recrutamento da vegetação local. A base de dados estruturada fornece um diagnóstico funcional para subsidiar pesquisas futuras sobre redes de interação ecológica e estratégias de conservação na unidade de conservação.

Referências

COSTA, F. R. C.; MAGNUSSON, W. E. The need for large-scale, integrated studies of biodiversity – the experience of the Brazilian Program for Biodiversity Research (PPBio). Natureza & Conservação, v. 8, n. 1, p. 3–12, 2010.

GARNIER, E. et al. Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties. Oxford: Oxford University Press, 2015.

LAVOREL, S.; GARNIER, E. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. Functional Ecology, v. 16, p. 545–556, 2002.

LETCHER, S. G. et al. Environmental gradients and the evolution of successional habitat specialization: a test case with 14 Neotropical forest sites. Journal of Ecology, v. 103, n. 5, p. 1276–1290, 2015.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, p. 853–858, 2000.

TABARELLI, M.; PERES, C. A.; MELO, F. P. L. The 'few winners and many losers' paradigm revisited: emerging prospects for tropical forest biodiversity. Biological Conservation, v. 155, p. 136–140, 2012.

VIOLLE, C. et al. Let the concept of trait be functional! Oikos, v. 116, p. 882–892, 2007.

DA SILVA, L. D. S. A. B., DA SILVA, J. B., SOUZA, C. S., GUIMARÃES, M. M., SALES, M. F., & CASTRO, C. C. (2021). Plant–animal interactions of understory species in an area of tropical rainforest, north-eastern Brazil. Austral Ecology. https://doi.org/10.1111/aec.13004

TABARELLI, M.; PERES, C. A. Abiotic and vertebrate seed dispersal in the Brazilian Atlantic forest: implications for forest regeneration. Biological Conservation, v. 106, n. 2, p. 165–176, 2002. DOI: 10.1016/S0006-3207(01)00243-9.

HOWE, H. F.; SMALLWOOD, J. Ecology of seed dispersal. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 13, p. 201–228, 1982. DOI: 10.1146/annurev.es.13.110182.001221.

KINOSHITA, L. S.; TORRES, R. B.; FORNI-MARTINS, E. R.; SPINELLI, T.; AHN, Y. J.; CONSTÂNCIO, S. S. Composição florística e síndromes de polinização e de dispersão da mata do Sítio São Francisco, Campinas, SP, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 2, p. 313–327, 2006.

YAMAMOTO, L. F.; KINOSHITA, L. S.; MARTINS, F. R. Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 21, n. 3, p. 553–573, 2007. DOI: 10.1590/S0102-33062007000300005.

ALMEIDA-NETO, M.; CAMPASSI, F.; GALETTI, M.; JORDANO, P.; OLIVEIRA-FILHO, A. Vertebrate dispersal syndromes along the Atlantic forest: broad-scale

patterns and macroecological correlates. Global Ecology and Biogeography, v. 17, n. 4, p. 503–513, 2008. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2008.00386.x.

Anexos



Figura 1 – Proporção das síndromes de dispersão registradas para os indivíduos arbóreos (N = 546) nas parcelas da faixa sensível do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN. A categoria "NA" agrupa os registros sem síndrome determinada devido à ausência de in



Figura 2 - Espécies zoocóricas com maior abundância de indivíduos nas faixas sensíveis das parcelas do PPBio na FLONA de Nísia Floresta, RN.



Figura 3. Distribuição do número de indivíduos por parcela de amostragem, categorizados de acordo com a síndrome de dispersão.

CÓDIGO: SB1117

AUTOR: REHVERSSON EMANOEL HORTENCIO BEZERRA

ORIENTADOR: FERNANDO VAGNER LOBO LADD

TÍTULO: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOQUANTITATIVAS NO CORTEX PREFRONTAL DE SAGUIS EM ESTADO DEPRESSIVO INDUZIDO

Resumo

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma das doenças mentais mais comuns, afetando milhões de pessoas e gerando grande impacto social e econômico. Alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, na neurogênese hipocampal e nos níveis de BDNF estão fortemente ligadas à depressão, além de mudanças neurodegenerativas em áreas corticais e subcorticais. Os tratamentos convencionais, baseados em antidepressivos monoaminérgicos, apresentam limitações, como resistência terapêutica, o que motiva a busca por novas alternativas.

Nesse contexto, psicodélicos como a ayahuasca e seu principal componente ativo, a DMT (N,N-dimetiltriptamina), têm se destacado como potenciais terapias. O estudo proposto investiga os efeitos da DMT em saguis juvenis (Callithrix jacchus) submetidos a estresse crônico, avaliando comportamento, níveis de cortisol fecal e alterações morfoquantitativas em regiões cerebrais críticas (hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e somatossensorial).

Palavras-chave: Transtorno depressivo maior, estereologia, cortex pré-frontal.

TITLE: Evaluation of Morpho-Quantitative Alterations in the Prefrontal Cortex of Marmosets with Induced Depressive State

Abstract

Major Depressive Disorder (MDD) is one of the most common mental illnesses, affecting millions worldwide and causing significant social and economic impact. Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels are strongly linked to depression, along with neurodegenerative changes in cortical and subcortical areas. Conventional treatments, mainly monoaminergic antidepressants, face limitations such as therapeutic resistance, driving the search for new alternatives.

In this context, psychedelics like ayahuasca and its main active compound, DMT (N,N-dimethyltryptamine), have emerged as potential therapies. The proposed study investigates the effects of DMT in juvenile marmosets (Callithrix jacchus) exposed to chronic stress, assessing behavior, fecal cortisol levels, and morpho-quantitative changes in key brain regions (hippocampus, striatum, prefrontal and somatosensory cortex).

Techniques such as stereology and immunohistochemistry will be used to analyze neuronal volume, number, density, and expression of markers like NeuN, BDNF, and 5-HT. It is expected that DMT will reveal relevant neurobiological mechanisms and demonstrate therapeutic potential in resistant depression, expanding knowledge on the relationship between stress, neuroplasticity, and psychedelics, and contributing to new clinical protocols.

Keywords: Major Depressive Disorder, Stereology, Prefrontal cortex.

Introdução

O transtorno depressivo maior (TDM) tem se tornado uma doença mental comum, afetando tantas pessoas como qualquer outra condição de saúde, abrangendo câncer e doenças cardíacas (WHO, 2023). Calcula-se que cerca de 3,8% da população mundial sofra de depressão, sendo jovens e mulheres os mais atingidos (WHO, 2023). O Brasil ocupa o segundo lugar em número de pessoas diagnosticadas com transtorno depressivo nas Américas, com 5,8% da população acometida com a doença (OPAS, 2020).
O TDM pode se apresentar em episódio único ou recorrente, podendo durar dias, sendo os sintomas diversos que influenciam nas relações do cotidiano (Jesulola et al., 2018; WHO, 2023). As alterações e distúrbios acarretam sintomas característicos, que podem ser psíquicos, fisiológicas ou comportamentais, como pensamentos recorrentes de morte (DSM-5, 2014). Uma das principais causas para esse transtorno é o estresse crônico, e a resposta biológica a esses estressores pode ocasionar uma desregulação na resposta humana (Da Silva et al., 2018; Bortolozzi et al., 2021; Grilo et al., 2022).
Muitos estudos têm se concentrado nas possíveis alterações cerebrais, causadas por esses estressores e que podem levar a episódios de depressão. Alguns estudos apontam que anormalidades do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) estão associadas a sintomas depressivos (De Sousa et al., 2021; Galvão et al., 2021; Lira-bandeira et al

2025). Outros apresentam alterações que os glicocorticoides causam no metabolismo do glutamato em situações de estresse agudo e crônico, onde alguns pacientes têm sido tratados com cetamina (Kawatake-Kuno et al., 2021; Grilo et al., 2022; Oliver et al., 2022).

O estresse também pode causar diminuição da neurogênese, mais precisamente no desenvolvimento de neuroblastos presentes no giro denteado do hipocampo, e a redução do volume desses novos neurônios (Jesulola et al., 2018; Bortolozzi et al., 2021). Outra frente de estudo está relacionada ao BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) que quando reduzido em células hipocampais pode modular a neuroplasticidade, e isso levar ao surgimento de sintomas do TDM (Almeida et al., 2019; Galvão et al., 2021). Alguns achados também apontam para alterações neurodegenerativas em áreas do córtex préfrontal (CPF) (Lima-Ojeda et al., 2017), achados compartilhados por nossa equipe de pesquisa.

Devido a esses vários fatores, é inconsistente definir uma única hipótese para a causa da depressão e seu tratamento, tendo em vista que a mais aceita, a diminuição dos níveis de amina biogênica, tem sido tratada cronicamente com antidepressivos a base de monoaminas, porém em muitos casos ocorre resistência nesse tratamento (Jesulola et. al., 2018). Esse fato impulsiona a comunidade científica a intensificar os estudos para compreender como esse transtorno se desenvolve, quais alterações biológicas emanam para seu surgimento ou a partir dele, e a buscar tratamentos alternativos, além dos farmacológicos.

Metodologia

O estudo utiliza o sagui (Callithrix jacchus) como modelo experimental translacional de depressão juvenil, validado em pesquisas anteriores. Os animais são mantidos em condições naturais de temperatura e luminosidade, acompanhados por médico veterinário e seguindo normas éticas do CONCEA. O sagui é considerado adequado por sua proximidade filogenética com humanos, comportamento social semelhante e possibilidade de avaliação não invasiva de hormônios fecais.

Serão utilizados 30 animais juvenis (7 a 9 meses), divididos em três grupos:

GC (grupo controle familiar): 10 animais (5 machos, 5 fêmeas).

GI (grupo isolado): 10 animais submetidos a isolamento social crônico.

GE (grupo experimental tratado com DMT): 10 animais isolados e posteriormente tratados.

O delineamento experimental segue protocolo validado por Galvão-Coelho (2017), dividido em duas fases:

Fase Basal (FB): observação comportamental por 4 semanas em grupo familiar.

Fase Experimental (FE): separação dos grupos e aplicação dos tratamentos por 3 meses.

GC permanece com a família e recebe solução salina.

GI passa por isolamento social crônico, sem contato visual, auditivo ou olfativo, recebendo salina.

GE também passa pelo isolamento, mas após caracterização do estado depressivo recebe doses de DMT por inalação.

O ciclo dura 120 dias para GC e GI, e 150 dias para GE, seguido de perfusão para coleta dos encéfalos.

Administração de DMT

Os animais do GE recebem três sessões de inalação de 10 minutos (dias 55, 85 e 115), com vaporização de 4 mg de DMT diluído em solução fisiológica, utilizando vaporizador médico (Volcano® Medic 2). Para reduzir estresse, caixas de nebulização em acrílico são previamente apresentadas e associadas a recompensas. GC e GI recebem apenas vaporização de solução salina.

Registro Comportamental

Os comportamentos são observados por 30 minutos diários entre 6h30 e 7h30, utilizando amostragem focal contínua. São registrados:

Frequência de marcação de cheiro, piloereção individual e deslocamento repetitivo.

Duração de ingestão alimentar, autocatação e coçar.

Anedonia avaliada pela ingestão de solução palatável (leite condensado).

Procedimentos finais

Ao término, os animais são sedados com cetamina e xilazina, eutanasiados conforme protocolos CEUA-UFRN. A perfusão transcardíaca ocorre em três fases: solução salina com anticoagulante, paraformaldeído 4% e fixador sacarose 15%. Após extração, os encéfalos são pós-fixados e preparados para microtomia.

São obtidas seis séries de cortes coronais de 40 µm, armazenados em solução anticongelante. Uma série é submetida à coloração de Nissl (destacando componentes celulares e regiões anatômicas). Outras séries passam por imunohistoquímica para expressão de 5-HT, BDNF e NeuN, enquanto duas ficam reservadas para análises futuras.

A coloração de Nissl e imunohistoquímica para NeuN permitem análises estereológicas tridimensionais, quantificando volumes nucleares e neuronais, número e densidade neuronal. As análises são feitas em microscópio Zeiss com software Stereoinvestigator. Um estudo piloto define parâmetros ideais de amostragem.

A imunohistoquímica avalia neurotransmissores e proteínas específicas, como fibras serotoninérgicas (5-HT) e expressão de BDNF, para investigar o potencial neurogênico da DMT. As marcações são analisadas por fotomicrografias digitais em microscópio Nikon, com quantificação de intensidade via software ImageJ.

Resultados e Discussões

* Estimar os efeitos da depressão e do DMT sobre o volume de regiões corticais e subcorticais (no hipocampo, estriado e nos córtex pré-frontal e somatossensorial) no encéfalo de machos e fêmeas que formam os diferentes grupos;

* Estimar os efeitos da depressão e do DMT sobre o numero total de neurônios de cada região (no hipocampo, estriado e nos córtex pré-frontal e somatossensorial) no encéfalo de machos e fêmeas que formam os diferentes grupos;;

* Estimar os efeitos da depressão e do DMT sobre a densidade neuronal em cada região de cada região (no hipocampo, estriado e nos córtex pré-frontal e somatossensorial);

* Estimar os efeitos da depressão e do DMT sobre o volume médio dos neurônios de cada de cada região (no hipocampo, estriado e nos córtex pré-frontal e somatossensorial);

* Estimar os efeitos da depressão e do DMT na imuno-expressão de BDNF e 5-HT nos nas regiões encefálicas (no hipocampo, estriado e nos córtex pré-frontal e somatossensorial).

Conclusão

Pesquisa em andamento,Resultados Esperados
Espera-se que a aplicação do protocolo de isolamento social crônico em saguis (Callithrix jacchus) induza alterações comportamentais e fisiológicas compatíveis com um estado depressivo, conforme descrito em modelos experimentais previamente validados para esta espécie. Entre essas alterações, projeta-se a ocorrência de aumento na frequência de comportamentos associados ao estresse, como piloereção individual, marcação de cheiro, deslocamento repetitivo e comportamentos estereotipados, além de redução de comportamentos associados à recompensa e ao bem-estar, tais como ingestão alimentar e consumo de soluções palatáveis. Adicionalmente, espera-se que os animais submetidos ao isolamento social apresentem elevação significativa nos níveis de cortisol fecal, refletindo a ativação do eixo hipotálamo–pituitária–adrenal (HPA) em resposta ao estresse crônico.

Do ponto de vista neuroanatômico, projeta-se que o estresse crônico induzido pelo isolamento social provoque alterações morfoquantitativas em regiões encefálicas envolvidas na regulação emocional, na resposta ao estresse e na modulação do

comportamento, especialmente no hipocampo, estriado e nos córtices pré-frontal e somatossensorial. Essas alterações poderão ser evidenciadas por meio da redução do volume de determinadas estruturas encefálicas, diminuição do número total de neurônios, modificações na densidade neuronal e alterações no volume médio neuronal, refletindo processos de remodelação estrutural associados à fisiopatologia da depressão. Espera-se, particularmente, que áreas como o hipocampo e o córtex pré-frontal apresentem maior susceptibilidade às alterações induzidas pelo estresse crônico, em virtude de sua conhecida participação nos circuitos neurais envolvidos na regulação emocional e cognitiva.

No que se refere aos efeitos da administração de dimetiltriptamina (DMT), espera-se que o tratamento seja capaz de modular, ao menos parcialmente, as alterações comportamentais, fisiológicas e estruturais induzidas pelo estresse crônico. Nesse sentido, projeta-se que os animais pertencentes ao grupo experimental tratado com DMT apresentem redução dos comportamentos associados ao estresse, bem como recuperação parcial de comportamentos relacionados à motivação e ao prazer, quando comparados aos animais submetidos apenas ao isolamento social. Da mesma forma, espera-se que o tratamento com DMT contribua para a modulação da resposta fisiológica ao estresse, refletida por níveis de cortisol fecal mais próximos aos observados nos animais do grupo controle.

Em relação às análises morfoquantitativas obtidas por meio da aplicação de métodos estereológicos tridimensionais, espera-se observar diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto aos parâmetros estruturais avaliados. Especificamente, projeta-se que os animais submetidos ao isolamento social apresentem redução no volume de regiões encefálicas específicas.

Referências

Almeida, RN, Galvão, ACdM, Da Silva, FS, Silva, EAS, Palhano-Fontes, F, MaiaDeOliveira, JP, et al. Modulation of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor by a Single Dose of Ayahuasca: Observation From a Randomized Controlled Trial. Front. Psychol., [place unknown], 2019, 10, 1234.

Amenábar, JM, Padilha, DMP, Hugo, FN, Fossati, ACM. The use of Stereology as Method in Histological Research. R. Fac. Odontol., Porto Alegre, 2003, 62-5 p., vol. 44, nº. 1.

Bortolozzi, A, Manashirov, S, Chen, A, Artigas, F. Oligonucleotides as therapeutic tools for brain disorders: Focus on major depressive disorder and Parkinson's disease. Pharmacology & Therapeutics, 2021, vol. 227.

Da Silva, FS, Silva, EA, Sousa Jr., GMD, Maia-De-Oliveira, JP, Soares-Rachetti, VDP, De Araujo, DB, Galvão-Coelho, NL. Acute effects of ayahuasca in a juvenile non-human primate model of depression. Brazilian Journal of Psychiatry, 2018, n. AHEAD, 0-0 p. De Sousa, MBC, Grilo, MLPdM, Galvão-Coelho, NL. Natural and Experimental Evidence Drives Marmosets for Research on Psychiatric Disorders Related to Stress. Front. Behav. Neurosci, 2021, vol. 15.

DSM-5. Manual diagnóstico e estatística de transtorno. Porto Alegre: Artmed, 2014, 160168 p.

Galvão, ACdeM, De Almeida, RN, Silva, EAdosS, Freire, FAM, Palhano-Fontes, F, Onias, H, et al. Cortisol Modulation by Ayahuasca in Patients With Treatment Resistant Depression and Healthy Controls. Frontiers in Psychiatry, 2018, vol. 9, 185 p.

Galvão, ACdeM, Almeida, RN, De Sousa, GMJr, Leocadio-Miguel, MA, PalhanoFontes, F, De Araujo, DB, et al. Pathophysiology of Major Depression by Clinical Stages. Front.
Psychol., 2021, 12, 641779.

Galvão-Coelho, NL, Galvão, ACM, Silva, FS, Sousa, MBC. Common Marmosets: A Potential Translational Animal Model of Juvenile Depression. Frontiers in Psychiatry, 2017, vol. 8, 175 p.

Grilo, MLPdeM, Sousa, GM, Mendonça, LAC, Lobão-Soares, B, Palhano-Fontes, F, Araujo, DB, et al. Prophylactic action of ayahuasca in a non-human primate model of depressive-like behavior. Frontier in Behavioral Neuroscience, 2022, 16:901425.

Howard, CV, Reed, MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microcospy. Bios Scientific, 2010, Liverpool, Oxford.

Jesulola, E, Micalos, P, Baguley, IJ. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? Behavioural Brain Research, 2018, vol. 341, 79-90 p.

Kawatake-Kuno A, Murai T, Uchida, S. A Multiscale View of the Mechanisms Underlying Ketamine's Antidepressant Effects: An Update on Neuronal Calcium Signaling. Front. Behav. Neurosci., 2021, 15:749180.

Ladd, FV, Ladd, AA, Ribeiro, AA, Costa, SB, Coutinho, BP, Feitosa, GA, et al. Zinc and glutamine improve brain development in suckling mice subjected to early postnatal malnutrition. Nutrition, 2010, vol. 26, 662–670 p.

Ladd, AABL, Ladd, FVL, Da Silva, AAP, Oliveira, MF, De Souza, RR, Coppi, AA. SCG postnatal remodelling – hypertrophy and neuron number stability – in Spix's Yellowtoothed Cavies (Galea spixii). Int. J. Devl. Neuroscience, 2012, vol. 30, 129-137 p.

Larsen, NY, Vihrs, N, Moller, J, Sporring, J, Tan, X, Li, X, et al. Layer III pyramidal cells in the prefrontal cortex reveal morphological changes in subjects with depression, schizophrenia, and suicide. Translational Psychiatry, 2022, vol.12, 363 p.

Leão, AC, Neto, AD, Sousa, MBC. New developmental stages for common marmosets (Callithrix jacchus) using mass and age variables obtained by K-means algorithm and self-organizing maps (SOM). Computers in Biology and Medicine, 2009, vol. 39(10), 853-859 p.

Lima-Ojeda, JM, Rupprecht, R, Baghai, TC. Neurobiology of depression: a neurodevelopmental approach. The World Journal of Biological Psychiatry, 2017, vol. 19
(5), 349-359 p.

Lira-Bandeira et al Ayahuasca partially preserves striatal integrity in juvenile non-human primates exposed to chronic stress: evidence from stereological evaluation. Frontiers.
Neuroanatomy, 2025 vol 18.

Oliver, PA, Snyder, AD, Feinn, R, Malov, S, Mcdiarmid, G, Arias, AJ. Clinical effectiveness of intravenous racemic ketamine infusions in a large community sample of patients with treatment-resistant depression, suicidal ideation, and generalized anxiety symptoms: a retrospective chart review. Journal of Clinical Psychiatry, 2022, 83, 42811.

OPAS – ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. COVID-19 - Intervenções
recomendadas em saúde mental e apoio psicossocial (SMAPS) durante a pandemia. 2020.
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Acesso em: 22 abr.2024.

Vedel-Jensen, EB, Gundersen, HJG. The rotator. J. Microsc., 1993, vol. 170, 35-44 p.

World Health Organization (WHO). Depressive disorder. 2023. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression. Acesso em: 22 abr.2024.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Feldon J. Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates. News Physiol Sci Int J Physiol Prod Jointly Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc. agosto de 2002;17:150–5.

Galvão-Coelho NL, Galvão AC de M, Silva FS da, Sousa MBC de. Common Marmosets: A Potential Translational Animal Model of Juvenile Depression. Front Psychiatry [Internet]. 21 de setembro de 2017 [citado 24 de maio de 2024];8. Disponível em:
https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsyt.2017.00175/full

Stevenson MF, Poole TB. An ethogram of the common marmoset (Calithrix jacchus jacchus): general behavioural repertoire. Anim Behav. maio de 1976;24(2):428–51.

Miller CT, Freiwald WA, Leopold DA, Mitchell JF, Silva AC, Wang X. Marmosets: A Neuroscientific Model of Human Social Behavior. Neuron. 20 de abril de 2016;90(2):219– 33.

Sousa MB, Ziegler TE. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (Callithrix jacchus) females. Am J Primatol. 1998;46(2):105–17.

de Castro Leão A, Duarte Dória Neto A, Bernardete Cordeiro de Sousa M. New developmental stages for common marmosets (Callithrix jacchus) using mass and age variables obtained by K-means algorithm and self-organizing maps (SOM). Comput Biol Med. 1o de outubro de 2009;39(10):853–9.

Hugo C, Seier J, Mdhluli C, Daniels W, Harvey BH, Du Toit D, et al. Fluoxetine decreases stereotypic behavior in primates. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1o de junho de 2003;27(4):639–43.

CÓDIGO: SB1147

AUTOR: MARTHA DE MEDEIROS GALVAO

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Adequabilidade ambiental relativa de Clibanarius symmetricus na costa brasileira: modelagem espacial bayesiana e sensibilidade da priorização costeira

Resumo

A modelagem de registros de ocorrência pode orientar novas amostragens costeiras, desde que a adequabilidade prevista seja interpretada considerando a disponibilidade ambiental e as limitações dos dados. Este estudo avaliou a contribuição da profundidade e da declividade para a adequabilidade relativa de Clibanarius symmetricus na costa brasileira, em domínio restrito a 0–30 m de profundidade e até 40 km da costa. Foram utilizados 34 registros, distribuídos em 31 células ambientais, e dez conjuntos de 102 pseudo-ausências. Compararam-se três modelos binomiais com campo espacial Barrier SPDE: referência, batimétrico e topográfico. A validação em três partições espaciais totalizou 90 ajustes. O modelo topográfico apresentou melhor desempenho, com AUC de 0,771 ± 0,051, Brier de 0,157 e log-loss de 0,484. Profundidade e log-declividade apresentaram associações negativa e positiva, respectivamente, nos dez ajustes completos. O núcleo reuniu 651 células, cerca de 19.595 km², das quais 97 foram selecionadas em pelo menos 80% de 81 cenários de limiares. Compreendeu 167 manchas contíguas, sendo 62,3% unicelulares. Os resultados sustentam a utilidade exploratória do modelo topográfico, mas a incerteza taxonômica, o deslocamento de coordenadas, a pequena amostra e a sensibilidade aos limiares limitam a inferência. O produto é uma superfície contínua de adequabilidade relativa, com incerteza, para amostragem e formulação de hipóteses.

Palavras-chave: distribuição potencial; validação espacial; R-INLA; pseudo-ausências.

TITLE: Relative environmental suitability of Clibanarius symmetricus on the Brazilian coast: Bayesian spatial modeling and sensitivity of coastal prioritization.

Abstract

Occurrence record modeling can guide coastal sampling when predicted suitability is interpreted alongside environmental availability and data limitations. This study evaluated the contribution of depth and slope to the relative suitability of Clibanarius symmetricus along the Brazilian coast, within a domain restricted to depths of 0–30 m and up to 40 km from shore. We used 34 records across 31 environmental cells and ten

sets of 102 pseudo-absences. Three binomial models with a Barrier SPDE spatial field were compared: reference, bathymetric, and topographic. Validation across three spatial partitions resulted in 90 model fits. The topographic model performed best, with an AUC of 0.771 ± 0.051, Brier score of 0.157, and log-loss of 0.484. Depth and log-slope showed negative and positive associations, respectively, across the ten full fits. The core area comprised 651 cells (approximately 19,595 km²), with 97 selected in at least 80% of 81 threshold scenarios. It included 167 contiguous patches, 62.3% of which were single-cell patches. Although the results support the exploratory utility of the topographic model, taxonomic uncertainty, coordinate displacement, small sample size, and threshold sensitivity limit inference. The output is a continuous surface of relative suitability with uncertainty estimates to support sampling and hypothesis formulation.

Keywords: potential distribution; spatial validation; R-INLA; pseudo-absences.

Introdução

A organização espacial de registros biológicos oferece uma base para investigar associações ambientais e orientar levantamentos em áreas pouco conhecidas. Em ambientes costeiros, entretanto, a proximidade entre terra e mar, a heterogeneidade dentro de cada célula ambiental e a distribuição desigual do esforço de coleta exigem atenção à escala e à qualidade das coordenadas. Bases ambientais padronizadas, como Bio-ORACLE e MARSPEC, permitem construir análises regionais comparáveis, mas sua resolução não elimina as limitações dos registros que alimentam os modelos (Assis et al., 2024; Sbrocco e Barber, 2013). A identidade taxonômica constitui uma questão adicional para Clibanarius symmetricus (Randall, 1840). Evidências moleculares e morfológicas sustentaram a revalidação da espécie em relação a C. vittatus, nome historicamente utilizado para parte dos registros sul-americanos (Negri et al., 2014). Essa revisão torna indispensável distinguir ocorrências publicadas sob o nome atual de registros legados e de identificações confirmadas por exame independente. A adoção de um nome aceito por um agregador de dados não equivale, por si só, à revisão dos espécimes ou das imagens que sustentam cada ocorrência. Na ausência de levantamentos padronizados de presença e ausência, pseudo-ausências podem representar o ambiente disponível para comparação com os locais registrados. Sua seleção e quantidade influenciam o ajuste e a avaliação dos modelos, motivo pelo qual a variação entre amostragens de pseudo-ausências deve ser examinada (Barbet-Massin et al., 2012). Nesse contexto, a resposta prevista caracteriza um contraste condicionado ao desenho amostral, sem estimar automaticamente a probabilidade absoluta de ocorrência. Também é necessário avaliar a transferência espacial: partições aleatórias podem produzir avaliações otimistas quando a dependência entre observações é ignorada (Roberts et al., 2017). Modelos espaciais bayesianos permitem combinar covariáveis ambientais e estrutura residual em uma mesma formulação. A aproximação por equações diferenciais parciais estocásticas, SPDE, possibilita representar campos espaciais por estruturas computacionalmente esparsas (Lindgren et al., 2011). Sua extensão com barreiras físicas modifica a dependência através de áreas como a superfície continental, sendo pertinente a domínios aquáticos recortados pela linha de costa (Bakka et al., 2019). A inferência por aproximações de Laplace aninhadas integradas, INLA, oferece um procedimento determinístico para essa classe de modelos (Rue et al., 2009). Este estudo teve como objetivo estimar a adequabilidade relativa de C. symmetricus em um domínio costeiro operacional brasileiro e avaliar a estabilidade

de uma síntese de prioridade espacial. Especificamente, foram comparados modelos com e sem preditores topográficos, examinados os sinais dos efeitos ambientais e a incerteza entre ajustes, e quantificada a dependência das áreas selecionadas em relação a limiares operacionais. A análise foi concebida como exploração preditiva para orientar amostragem, sem inferir abundância, conectividade populacional ou ocupação efetiva das áreas previstas.

Metodologia

Registros de ocorrência e escala de análise A base reuniu 34 registros de C. symmetricus obtidos via GBIF (2013–2026). O processamento incluiu avaliação taxonômica e espacial, proximidade costeira e afinamento em células de 0,05°. Após a compatibilização ambiental, os registros ocuparam 31 células marinhas, mantendo-se as 34 linhas na modelagem. Nove coordenadas foram diretamente utilizáveis e 25 deslocadas para células elegíveis, incluindo três realinhamentos à faixa de 0–30 m. O deslocamento máximo foi 11,08 km e a mediana, 4,51 km. Esses ajustes são cartográficos, não novas observações, e os registros permanecem sujeitos à validação humana. Domínio ambiental e preditores O domínio compreendeu profundidade de 0–30 m e distância à costa ≤40 km, totalizando 9.830 células e ~293.128 km². A topografia foi obtida do Bio-ORACLE (terrain_characteristics), em WGS84 e resolução ~0,05°. A distância à costa, proveniente de MARSPEC, foi usada apenas para definir a disponibilidade (Assis et al., 2024; Sbrocco e Barber, 2013). A profundidade foi mantida em metros e a declividade transformada por ln. Ambas foram padronizadas sobre toda a grade: profundidade = 15,771 ± 7,717 m e log-declividade = −3,416 ± 1,007. Pseudo-ausências e modelagem espacial Foram sorteadas 102 pseudo-ausências por repetição (razão 1:3), sem reposição e excluindo as 31 células com registros. Cada conjunto teve 136 linhas; as dez repetições compartilham as mesmas ocorrências e não são amostras biológicas independentes. A resposta binária seguiu distribuição Bernoulli e ligação logit. M0 incluiu intercepto e campo espacial; M1 acrescentou profundidade; M2, profundidade e log-declividade: $\text{logit}(p_i) = \beta_0 + \beta_1 z(\text{profundidade}_i) + \beta_2 z[\ln(\text{declividade}_i)] + w(s_i)$. O Barrier SPDE utilizou malha com 10.437 vértices e 20.687 triângulos, sendo 8.538 barreiras. Os alcances foram 200 km (regular) e 20 km (barreira), representando dependência espacial residual, não dispersão ou conectividade biológica. Os efeitos fixos receberam prioris N(0,10), e o desvio-padrão espacial, $P(\sigma > 1)=0,01$. Os ajustes foram realizados no R-INLA com simplified Laplace (Rue et al., 2009; Lindgren et al., 2011; Bakka et al., 2019). Comparação e validação Uma triagem anterior de sete formulações reteve M0–M2. A validação utilizou três partições espaciais em blocos de ~250 km, com 6–15 ocorrências por partição, totalizando 90 ajustes (3 modelos × 3 partições × 10 repetições). As predições fora da amostra foram avaliadas por AUC, average precision, Brier e log-loss; acurácia balanceada e TSS usaram limiares de Youden definidos apenas no treinamento. M2 foi selecionado como produto principal e M1 como análise de sensibilidade. Como a seleção ocorreu antes da validação, sem repetir a seleção de variáveis em cada partição, a avaliação não é validação aninhada e limita inferências de generalização. Ensemble, incerteza e suporte ambiental Após a validação, M1 e M2 foram ajustados aos dados completos das dez repetições (20 ajustes). O ensemble correspondeu à média das dez médias posteriores. A estabilidade foi avaliada por médias, amplitudes, desvios-padrão, concordância dos sinais e proporção de intervalos de credibilidade de 95% sem zero. A incerteza total combinou a média das variâncias posteriores e a variância entre as dez médias (R−1),

sendo o desvio-padrão a raiz dessa soma. Trata-se de medida operacional, que não contempla todas as fontes de erro. O suporte ambiental foi estimado pelo fecho convexo das combinações de preditores dos conjuntos completos, incluindo ocorrências e pseudo-ausências. A frequência de inclusão nas dez repetições indicou suporte forte (≥0,80), moderado (0,50–<0,80) ou extrapolação frequente (<0,50). Esse diagnóstico representa cobertura ambiental, não ocupação ou suporte biológico. A sensibilidade estrutural foi medida pela diferença entre os ensembles M2 e M1. Hierarquia e manchas O núcleo central exigiu: estar nos 20% superiores de adequabilidade em ≥8/10 repetições; suporte ambiental forte; desvio-padrão total < percentil 90 (~0,231814); e |M2−M1| <0,20. Esses critérios definem prioridade relativa, não presença/ausência. Foram avaliados 81 cenários, combinando rankings de 10%, 20% e 30%; frequências mínimas de 0,70, 0,80 e 0,90; quantis de incerteza de 0,80, 0,90 e 0,95; e diferenças máximas entre modelos de 0,10, 0,20 e 0,30, mantendo o suporte forte fixo. A frequência de seleção foi usada como indicador de estabilidade. A, B e C corresponderam, respectivamente, a ≥80%, 50–<80% e <50% de seleção; D reuniu células externas ao núcleo selecionadas em algum cenário e E as nunca selecionadas. “Persistência” refere-se apenas à repetição da classificação entre cenários, sem significado temporal ou demográfico. As manchas foram identificadas por contiguidade de oito vizinhos, para A+B+C e A, sem remoção de manchas pequenas. A análise regional utilizou faixas descritivas: Norte–Equatorial (≥−5°), Nordeste (−15° a <−5°), Leste–Sudeste (−25° a <−15°) e Sul (<−25°). Essas faixas não são regionalizações oficiais, e as áreas correspondem à soma aproximada das células, não ao habitat efetivamente ocupado.

Resultados e Discussões

Desempenho e efeitos ambientais O M2 apresentou o melhor desempenho médio nas seis métricas de avaliação, seguido por M1 e M0 (Tabela 1; Figura 1). A AUC foi 0,771 (DP=0,051), frente a 0,726 no M1 e 0,488 no M0. Em relação a M1, a inclusão da declividade aumentou a AUC em 0,045 e reduziu o Brier em 0,014 e o log-loss em 0,026. Na comparação pareada dos dez sorteios, M2 apresentou maior AUC e average precision em nove repetições e menores Brier e log-loss em oito, indicando vantagem predominante, embora não uniforme. Os efeitos ambientais apresentaram sinais estáveis nos ajustes completos (Tabela 2; Figura 2). No M2, a profundidade apresentou coeficiente médio de −1,641, com médias posteriores entre −1,993 e −1,448. O sinal foi negativo nos dez ajustes e todos os IC95% individuais excluíram zero. A log-declividade apresentou coeficiente médio de 1,068, variando de 0,497 a 1,571; o sinal foi positivo nos dez ajustes e nove IC95% excluíram zero. No M1, a profundidade também apresentou associação negativa nos dez ajustes, com coeficiente médio de −1,503. Adequabilidade, incerteza e sensibilidade estrutural A adequabilidade média do M2 variou de aproximadamente 0,001 a 0,930 no domínio (Figura 3), devendo ser interpretada conjuntamente com incerteza e suporte ambiental (Figuras 4 e 5). A mediana do desvio-padrão total foi 0,109, enquanto as medianas dos componentes posterior e entre repetições foram 0,105 e 0,025, respectivamente. A mediana da fração da variância total atribuída aos sorteios foi 5,6%. Essas estatísticas foram calculadas separadamente e não devem ser somadas. O suporte ambiental foi forte em 8.627 células (87,8% do domínio), moderado em 476 (4,8%) e indicou extrapolação frequente em 727 (7,4%). As predições extrapoladas foram mantidas no produto contínuo, acompanhadas de diagnóstico explícito. M1 e M2 apresentaram correlação espacial de

Pearson de 0,876 e de Spearman de 0,839. A diferença absoluta mediana entre os modelos foi 0,036, alcançando 0,571 em algumas células. Em 324 células, a diferença foi superior a 0,20 (Figura S2), indicando que a inclusão da declividade produziu alterações localmente relevantes, apesar da elevada concordância espacial geral. Dimensão e estabilidade do núcleo central O núcleo central reuniu 651 células, correspondentes a 6,62% do domínio e aproximadamente 19.595 km² (6,68% da área total). Os níveis A, B e C compreenderam 97, 211 e 343 células, respectivamente (Tabela 3; Figura 6). O nível A representou 14,9% do núcleo e 0,99% de todo o domínio. As classes contextuais D e E reuniram 1.391 e 7.788 células, e a soma das cinco classes correspondeu às 9.830 células da máscara operacional. Nos 81 cenários de sensibilidade, o número de células selecionadas variou de 96 a 2.042, com mediana de 478. A similaridade mediana de Jaccard em relação ao núcleo central foi 0,381, enquanto a retenção mediana de suas células foi 47,3%. Esses resultados indicam dependência expressiva da delimitação espacial em relação aos limiares adotados. As 97 células do nível A constituem a parcela mais estável dentro da grade de cenários examinada, sem implicar estabilidade diante de outros critérios ou novos dados (Figura S3). Distribuição latitudinal e contiguidade A faixa Norte–Equatorial concentrou 446 células do núcleo central, aproximadamente 13.709 km², correspondendo a 68,5% das células e 70,0% da área do núcleo global (Tabela 4). Essa faixa também concentrou cerca de 64,7% da área de todo o domínio. Entretanto, a proporção da área regional incluída no núcleo foi de 7,23% no Norte–Equatorial, 7,45% no Nordeste, 4,14% no Leste–Sudeste e 6,55% no Sul. Assim, a maior extensão absoluta no Norte–Equatorial não correspondeu à maior proporção regional selecionada. O nível A reuniu 59 células no Norte–Equatorial, quatro no Nordeste, duas no Leste–Sudeste e 32 no Sul. Considerando cada núcleo regional, sua participação foi maior no Sul (36,8%), frente a 13,2%, 7,5% e 3,1% nas demais faixas. Os mapas regionais evidenciam a descontinuidade da classificação ao longo da costa (Figuras S6–S9). O núcleo central apresentou 167 manchas, com área mediana de 30,75 km². A maior reuniu 107 células, correspondendo a aproximadamente 3.289 km². Foram mantidas 104 manchas unicelulares, equivalentes a 62,3% do total. O nível A compreendeu 35 manchas, das quais 16 unicelulares (45,7%); sua maior mancha reuniu 13 células e aproximadamente 400 km² (Tabela 5; Figura S5). A distribuição das manchas indica concentração da área em poucas unidades maiores, acompanhada por numerosas unidades pequenas, considerando a resolução espacial e a regra de contiguidade adotadas. Contribuição preditiva da topografia A superioridade média de M2 sobre M0 e M1 indica que profundidade e declividade acrescentaram informação preditiva à estrutura espacial residual no desenho avaliado. A manutenção do sinal negativo da profundidade nos modelos ambientais reforça a associação com porções relativamente rasas dentro da faixa de 0–30 m. A inclusão da declividade aumentou a discriminação e reduziu os erros médios, embora essa vantagem não tenha ocorrido em todos os sorteios. Esses resultados sustentam a escolha operacional de M2 e a manutenção de M1 como referência de sensibilidade. Os coeficientes, entretanto, não identificam mecanismos causais. A declividade da grade pode representar contrastes topográficos amplos, sem necessariamente refletir o substrato ou o microambiente utilizado pela espécie. Da mesma forma, o coeficiente negativo de profundidade não demonstra preferência direta por uma profundidade específica. Como parte das coordenadas foi deslocada para células marinhas rasas elegíveis, essa compatibilização pode ter alterado as relações entre ocorrência e ambiente. Assim, a associação observada deve ser confrontada com dados de campo e análises que avaliem a influência dos registros deslocados. Robustez da predição e da classificação A elevada concordância global entre M1 e M2 coexistiu

com diferenças locais expressivas. Portanto, uma alta correlação espacial não implica equivalência entre os modelos em todos os locais. A análise da diferença local, da incerteza total e do suporte ambiental permite identificar limitações que um único indicador de desempenho não representa. O suporte baseado no fecho convexo inclui pseudo-ausências e, portanto, indica a cobertura do espaço de ajuste, não a ocorrência da espécie em todas as combinações ambientais consideradas suportadas. A amplitude de 96 a 2.042 células entre cenários demonstra que a extensão da área prioritária depende fortemente das escolhas de classificação. A frequência de seleção torna essa dependência explícita. O nível A representa um conjunto reduzido de locais relativamente estáveis sob os critérios testados, enquanto B e C expressam maior sensibilidade. As frequências dos 81 cenários, contudo, não devem ser interpretadas probabilisticamente como ocorrência ou persistência populacional, pois os cenários são combinações analíticas equiponderadas e não estados ambientais amostrados de uma distribuição conhecida. Por isso, a superfície contínua deve permanecer como resultado principal. A hierarquia sintetiza a informação para fins operacionais, mas reduz detalhes e incorpora critérios específicos. D e E não representam classes de ausência ou habitat comprovadamente inadequado; sua exclusão do núcleo operacional pode refletir posição no ranking, extrapolação, incerteza, sensibilidade estrutural ou uma combinação desses fatores. Leitura regional e planejamento de amostragem A concentração absoluta do núcleo no Norte–Equatorial deve ser interpretada considerando a disponibilidade espacial, pois quase dois terços da área do domínio pertencem a essa faixa, contribuindo para seu predomínio no total selecionado. A comparação proporcional mostra valores próximos entre Norte–Equatorial e Nordeste e participação relativamente elevada do nível A no núcleo sul. Esses contrastes distinguem extensão absoluta, proporção regional e estabilidade da classificação, sem estabelecer uma hierarquia de importância biológica entre regiões. Os resultados podem orientar um desenho de amostragem que represente simultaneamente áreas de alta adequabilidade, maior incerteza, diferenças entre modelos e distintas faixas latitudinais. Concentrar novas observações apenas no nível A reduziria a capacidade de avaliar limites e omissões da predição. Uma validação informativa deve incluir também locais externos ao núcleo e registrar esforço, método de detecção, habitat e identificação taxonômica. O desempenho em dados novos deve ser avaliado sem reutilizá-los para definir os critérios testados. A contiguidade cartográfica não permite inferir conectividade. Manchas separadas no raster podem ou não corresponder a populações conectadas, e a vizinhança de oito direções não representa transporte larval ou continuidade de habitat em escala fina. A conservação das manchas unicelulares evita uma simplificação cartográfica não sustentada pelos dados, mas sua interpretação deve reconhecer que a grade não resolve processos internos às células. Limitações e alcance da inferência A principal limitação é a base de ocorrência pequena e ainda sujeita à confirmação individual. Os 34 registros correspondem a apenas 31 células ambientais e foram obtidos na consulta ao GBIF sob o nome atual. A revisão taxonômica que separou C. symmetricus de C. vittatus reforça a necessidade de verificar a evidência de identificação, sem presumir que a nomenclatura registrada resolva essa questão (Negri et al., 2014). O deslocamento de 25 coordenadas, em alguns casos superior ao tamanho aproximado de uma célula, acrescenta incerteza que não foi explicitamente propagada aos mapas. A repetição de pseudo-ausências avalia apenas parte da variabilidade do desenho: não incorpora novos registros de presença, não corrige automaticamente vieses de coleta nem estima detectabilidade. A razão 1:3 e a máscara de disponibilidade condicionam a resposta, enquanto dependência espacial, prioris e alcance fixo condicionam o componente residual. Embora Barbet-Massin et al. (2012) sustentem a avaliação da influência das pseudo-ausências, não

demonstram que a razão adotada seja ótima para este estudo. A validação espacial em três partições é mais adequada ao problema de transferência do que uma avaliação que desconsidere a estrutura espacial, mas permanece dependente da configuração e do desequilíbrio dos blocos (Roberts et al., 2017). Os mesmos registros e partições foram reutilizados nos dez sorteios; não houve validação temporal nem conjunto externo independente. Além disso, a triagem prévia dos modelos impede considerar essa avaliação totalmente externa ao processo de seleção. Assim, os resultados indicam desempenho condicionado às alternativas comparadas, e não superioridade universal da formulação topográfica. Por fim, a resolução de 0,05°, a restrição a 0–30 m e até 40 km da costa e a representação simplificada do ambiente limitam a escala da inferência. O índice de incerteza total reúne incerteza posterior e variação entre sorteios, mas não contempla todas as fontes de erro taxonômico, posicional, ambiental e estrutural. As auditorias de integridade demonstram coerência entre arquivos, tabelas e camadas, mas não substituem a verificação ecológica nem eliminam essas limitações.

Conclusão

O modelo com profundidade, log-declividade e campo Barrier SPDE apresentou o melhor desempenho espacial agregado entre as três alternativas avaliadas. Os sinais ambientais permaneceram estáveis nos dez ajustes completos, embora a extensão do núcleo de prioridade tenha sido sensível aos limiares. A superfície contínua, acompanhada de incerteza, suporte ambiental e comparação estrutural, constitui o principal resultado, enquanto a hierarquia A–E oferece uma síntese complementar para o planejamento de amostragem. A confirmação das ocorrências e a validação com novos dados são necessárias antes de ampliar as inferências ecológicas ou aplicar os produtos em decisões de manejo. Os mapas não estimam abundância, ocupação absoluta, conectividade ou limites de proteção. Os resultados foram extraídos dos produtos consolidados nas etapas 09K e 10A e de arquivos anteriores de métodos e diagnósticos. A conferência editorial reproduziu as contagens das classes, as comparações resumidas e os hashes dos 53 arquivos dos dois inventários. Nenhum modelo foi reajustado, nem limiares ou rasters originais foram alterados. Antes da submissão, devem ser acrescentados o endereço do repositório público, o identificador persistente da consulta de ocorrências e as condições de reutilização dos registros. Informações sobre financiamento, autoria, agradecimentos, conflitos de interesse e uso de inteligência artificial devem ser completadas e validadas pelos autores conforme as exigências do periódico. O relatório de fechamento registra R 4.4.2 e terra 1.8-29, mas não informa a versão do INLA utilizada nos ajustes, que deverá ser recuperada do ambiente correspondente.

Referências

Assis, J.; Fernández Bejarano, S. J.; Salazar, V. W.; Schepers, L.; Gouvêa, L.; Fragkopoulou, E.; Leclercq, F.; Vanhoorne, B.; Tyberghein, L.; Serrão, E. A.; Verbruggen, H.; De Clerck, O. (2024). Bio-ORACLE v3.0. Pushing marine data layers to the CMIP6 Earth System Models of climate change research. Global Ecology and Biogeography, 33, e13813. https://doi.org/10.1111/geb.13813 Bakka, H.; Vanhatalo, J.; Illian, J. B.; Simpson, D.; Rue, H. (2019). Non-stationary Gaussian models with

physical barriers. Spatial Statistics, 29, 268–288. https://doi.org/10.1016/j.spasta.2019.01.002 Barbet-Massin, M.; Jiguet, F.; Albert, C. H.; Thuiller, W. (2012). Selecting pseudo-absences for species distribution models: how, where and how many? Methods in Ecology and Evolution, 3, 327–338. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00172.x Lindgren, F.; Rue, H.; Lindström, J. (2011). An explicit link between Gaussian fields and Gaussian Markov random fields: the stochastic partial differential equation approach. Journal of the Royal Statistical Society: Series B, 73, 423–498. https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2011.00777.x Negri, M.; Lemaitre, R.; Mantelatto, F. L. (2014). Molecular and morphological resurrection of Clibanarius symmetricus (Randall, 1840), a cryptic species hiding under the name for the “thinstripe” hermit crab C. vittatus (Bosc, 1802) (Decapoda: Anomura: Diogenidae). Journal of Crustacean Biology, 34, 848–861. https://doi.org/10.1163/1937240X-00002277 Roberts, D. R.; Bahn, V.; Ciuti, S.; Boyce, M. S.; Elith, J.; Guillera-Arroita, G.; Hauenstein, S.; Lahoz-Monfort, J. J.; Schröder, B.; Thuiller, W.; Warton, D. I.; Wintle, B. A.; Hartig, F.; Dormann, C. F. (2017). Cross-validation strategies for data with temporal, spatial, hierarchical, or phylogenetic structure. Ecography, 40, 913–929. https://doi.org/10.1111/ecog.02881 Rue, H.; Martino, S.; Chopin, N. (2009). Approximate Bayesian inference for latent Gaussian models by using integrated nested Laplace approximations. Journal of the Royal Statistical Society: Series B, 71, 319–392. https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2008.00700.x Sbrocco, E. J.; Barber, P. H. (2013). MARSPEC: ocean climate layers for marine spatial ecology. Ecology, 94, 979. https://doi.org/10.1890/12-1358.1

Anexos



Figura 1. Desempenho dos modelos na validação espacial. Os pontos representam médias das métricas entre dez conjuntos de pseudo-ausências, com três partições espaciais em cada conjunto. Os segmentos partem de zero e não são intervalos de incerteza.



Figura 2. Estabilidade dos coeficientes ambientais nos dez ajustes completos de cada modelo. Pontos: média das médias posteriores; barras: mínimo e máximo das médias posteriores. As barras não representam intervalos de credibilidade de 95%



Figura 3. Adequabilidade ambiental relativa média do ensemble M2 para Clibanarius symmetricus. A superfície corresponde à média de dez ajustes com profundidade, log-declividade e campo Barrier SPDE no domínio de 0–30 m e até 40 km da costa



Figura 4. Desvio-padrão total associado ao ensemble M2, redesenhado a partir dos valores por célula, sem alteração dos resultados. O índice combina a média das variâncias posteriores e a variância amostral entre as dez médias previstas.



Figura 5. Suporte ambiental da predição M2, medido pela frequência de inclusão no fecho convexo de profundidade e log-declividade nos dez conjuntos completos de ajuste, incluindo ocorrências e pseudo-ausências.



Figura 6. Hierarquia final de prioridade relativa. As classes A, B e C particionam o núcleo central de 651 células. A indica frequência de seleção ≥ 80% nos 81 cenários; B, de 50% a menos de 80%; C, menor frequência dentro do núcleo central.



Tabela 1. Médias entre dez repetições. DP: desvio-padrão entre sorteios de pseudo-ausências. Valores maiores indicam melhor desempenho, exceto Brier e log-loss. M0 contém intercepto e campo espacial; não é um modelo apenas com intercepto.



Tabela 2. Média e DP calculados entre as dez médias posteriores dos ajustes completos; amplitude: mínimo e máximo dessas médias. Todos os sinais foram concordantes. IC95%: intervalo de credibilidade individual. A amplitude não é um intervalo de credibilid



Tabela 3. A: subnúcleo persistente; B: persistência moderada; C: sensível aos limiares; D: envelope alternativo fora do núcleo; E: fora do envelope testado. A+B+C = 651 células e 19.595,3 km². As médias são índices condicionais ao desenho.



Tabela 4. A, B e C são contagens de células. A última coluna divide a área A+B+C pela área do domínio na respectiva faixa; não é a proporção de células da tabela original. Limites latitudinais definidos nos métodos.



Tabela 5. Manchas definidas por vizinhança de oito direções na grade. Todas as manchas foram mantidas. Contiguidade no raster não equivale a conectividade populacional.

CÓDIGO: SB1152

AUTOR: MARIA CLARA DE FREITAS OLIVEIRA

COAUTOR: CYNTHIA MEIRA DE ALMEIDA GODOY

COAUTOR: KARINNA VERISSIMO MEIRA TAVEIRA

COAUTOR: ISABELA SILVA VIANA

ORIENTADOR: RENATA VEIGA ANDERSEN CAVALCANTI

TÍTULO: A Eficiência Mastigatória de Pacientes Pós-Cirurgia Bariátrica após Terapia Miofuncional Orofacial: estudo piloto

Resumo

Introdução: A cirurgia bariátrica promove mudanças que podem repercutir nas funções orofaciais, especialmente na mastigação. A Terapia Miofuncional Orofacial (TMO) pode contribuir para a adequação das condições miofuncionais e da eficiência mastigatória. Objetivo: Avaliar mudanças na eficiência mastigatória após TMO em mulheres submetidas à cirurgia bariátrica, em comparação com orientações fonoaudiológicas. Método: Estudo piloto longitudinal e quase-experimental, com sete mulheres (média de 49 anos). Cinco realizaram dez sessões individuais de TMO e duas receberam orientações fonoaudiológicas. Utilizaram-se o MBGR reduzido, Questionário Alimentar e teste de eficiência mastigatória com análise granulométrica de carne bovina. Resultados: Após o acompanhamento, observaram-se mudanças miofuncionais nos dois grupos, mais frequentes no grupo TMO. Ao final, seis participantes apresentaram eficiência mastigatória boa e uma regular. No grupo TMO, três passaram de regular para boa, uma de péssima para boa e uma permaneceu boa. No grupo comparação, uma passou de regular para boa e outra de péssima para regular. Conclusão: Houve mudanças na eficiência mastigatória e em componentes miofuncionais nos dois grupos. O reduzido tamanho amostral, o desequilíbrio entre os grupos e as limitações metodológicas não permitem atribuí-las à TMO, devendo os achados serem considerados preliminares.

Palavras-chave: Obesidade. Cirurgia bariátrica. Terapia miofuncional. Mastigação.

TITLE: OROFACIAL MYOFUNCTIONAL THERAPY AND MASTICATION EFFICIENCY AFTER BARIATRIC SURGERY: PILOT STUDY

Abstract

Introduction: Bariatric surgery induces changes that may affect orofacial functions, particularly mastication. Orofacial Myofunctional Therapy (OMT) may contribute to improving myofunctional conditions and masticatory efficiency. Objective: To evaluate changes in masticatory efficiency following OMT in women who underwent bariatric surgery, compared with those receiving speech-language therapy guidance. Methods: This was a longitudinal, quasi-experimental pilot study involving seven women (mean age: 49 years). Five participants underwent ten individual OMT sessions, while two received speech-language therapy guidance. The reduced MBGR protocol, a Food Questionnaire, and a masticatory efficiency test with granulometric analysis of beef were used. Results: Following the intervention period, myofunctional changes were observed in both groups, with greater frequency in the OMT group. At the end of the follow-up, six participants presented good masticatory efficiency and one presented regular efficiency. In the OMT group, three participants improved from regular to good efficiency, one from poor to good, and one remained at a good level. In the comparison group, one participant improved from regular to good efficiency, while the other improved from poor to regular. Conclusion: Changes in masticatory efficiency and myofunctional components were observed in both groups. The small sample size, imbalance between groups, and methodological limitations do not allow these changes to be a

Keywords: Obesity. Bariatric surgery. Myofunctional therapy. Mastication.

Introdução

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial caracterizada pelo excesso de adiposidade, podendo ocasionar disfunções orgânicas, limitações diárias e comorbidades como diabetes mellitus, hipertensão e doenças cardiovasculares (RUBINO et al., 2025). Constitui um problema de saúde pública que requer cuidado contínuo e interdisciplinar (OMS, 2023a, 2023b; SANTOS; SILVA; GODOY, 2019).

Quando o tratamento clínico não produz resposta suficiente e os critérios de indicação são atendidos, a cirurgia bariátrica pode favorecer perda ponderal e controle de comorbidades. Entretanto, as alterações anatômicas e fisiológicas decorrentes do procedimento exigem mudanças na quantidade, na consistência e no ritmo de ingestão dos alimentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA, 2017; BOERLAGE et al., 2019). A adaptação pós-operatória, portanto, depende também de novos comportamentos alimentares e de acompanhamento multiprofissional.

O sistema estomatognático integra estruturas ósseas, musculares, dentárias, articulares e nervosas envolvidas na mastigação, deglutição, respiração e fala. A mastigação compreende incisão, trituração e pulverização, com participação coordenada de mandíbula, língua, lábios e bochechas na formação do bolo alimentar (DOUGLAS,

2002; FELÍCIO, 1999). Alterações de tônus, mobilidade ou coordenação podem resultar em fragmentação insuficiente do alimento e maior esforço durante a alimentação.

No pós-operatório bariátrico, alterações no processamento oral dos alimentos e na mastigação podem estar associadas a dificuldades durante a alimentação, incluindo entalos, náusea, regurgitação e limitação do consumo de carnes e outros alimentos sólidos. A tolerância alimentar e o comportamento durante as refeições são, portanto, aspectos importantes do acompanhamento após o bypass gástrico em Y de Roux (GODOY et al., 2018). O questionário Quality of Alimentation, traduzido e adaptado para o português brasileiro, auxilia na avaliação da satisfação e da tolerância a diferentes consistências (LOMACHINSKY et al., 2024).

Alterações miofuncionais podem estar presentes antes da cirurgia. Godoy e Silva (2007) descreveram alterações miofuncionais em pacientes com obesidade mórbida, e Silva, Tanigute e Tessitore (2014) defenderam a inclusão da avaliação fonoaudiológica no protocolo bariátrico. Estudos recentes também identificaram modificações na atividade muscular, força de mordida e outros parâmetros do sistema estomatognático em pessoas com obesidade antes e depois da cirurgia (HUNGER MALEK-ZADEH et al., 2022; GUALDRÓN-BOBADILLA et al., 2022).

A atuação fonoaudiológica no cuidado da obesidade e da cirurgia bariátrica contempla avaliação, orientação e intervenção sobre as funções orofaciais (CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA, 2023). Experiências interdisciplinares reforçam a necessidade de integrar condições dentárias, adaptação de próteses e desempenho mastigatório no acompanhamento do paciente (NASCIMENTO et al., 2023). O MBGR reduzido permite sistematizar a avaliação das estruturas e funções orofaciais e acompanhar mudanças ao longo da intervenção (PEREIRA, 2023).

A Terapia Miofuncional Orofacial (TMO) utiliza exercícios de mobilidade, tonicidade e coordenação associados ao treino funcional. No contexto bariátrico, pode incluir conscientização da mastigação, adequação do ritmo, controle do volume, postura e organização da deglutição (FELÍCIO, 1999; SALES; MOURÃO, 2020). Programas aplicados a outras populações oferecem apoio indireto para a estruturação dessas condutas, embora seus resultados não possam ser extrapolados diretamente para pacientes bariátricos (MIGLIORUCCI; PASSOS; BERRETIN-FELIX, 2017; SALINAS et al., 2025).

Diante da escassez de pesquisas específicas, este estudo piloto teve como objetivo avaliar mudanças na eficiência mastigatória após um programa de TMO em pacientes no pós-operatório de cirurgia bariátrica, em comparação com um grupo de comparação que recebeu orientações fonoaudiológicas.

Metodologia

Esta pesquisa caracteriza-se como um estudo piloto longitudinal, quase-experimental, com avaliação antes e após o período de acompanhamento e grupo de comparação. Foi

realizada entre julho e outubro de 2025, na Clínica-Escola do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com pacientes acompanhadas no Serviço de Obesidade e Doenças Relacionadas do Hospital Universitário Onofre Lopes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob parecer nº 7.698.819, de 9 de julho de 2025. Todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram avaliados 22 pacientes. Após as recusas e a aplicação dos critérios de elegibilidade, 10 participantes foram identificadas por numeração sequencial e distribuídas aleatoriamente entre os Grupo Intervenção (GI) e o Grupo Comparação (GC) por meio de procedimento de alocação realizado no site Random.org. O tempo de pós-operatório variou de três meses a dois anos. Foram incluídas pessoas com pelo menos três meses de pós-operatório, queixas ou sinais de intolerância alimentar e alterações na mastigação ou na motricidade orofacial. Foram excluídos indivíduos com condições neurológicas ou psiquiátricas que comprometessem a participação e aqueles com próteses desajustadas. Todas as participantes utilizavam próteses dentárias parciais consideradas ajustadas após avaliação odontológica.

Ao final, apenas sete mulheres concluíram o protocolo, com média de idade de 49 anos e cirurgia realizada entre 2023 e 2025. O Grupo Intervenção (GI) ficou composto por cinco participantes e o Grupo Comparação (GC) por duas. As avaliações iniciais e finais foram realizadas com os mesmos instrumentos e conduzidas pela pesquisadora responsável.

A avaliação miofuncional utilizou o Exame Clínico Miofuncional Orofacial - versão reduzida do MBGR (PEREIRA, 2023). Foram examinados aspectos extra e intraorais, tônus de lábios, bochechas, mento e língua, mobilidade de lábios, língua, véu palatino e mandíbula, além de respiração, mastigação, deglutição e fala. No protocolo, escores mais baixos representam menor ocorrência de alterações nos aspectos avaliados.

A tolerância alimentar foi investigada pelo Questionário Alimentar adaptado para português brasileiro (LOMACHINSKY et al., 2024). A pontuação varia de zero a 27, e valores mais elevados correspondem a melhor tolerância alimentar; enquanto escores mais baixos indicam maior ocorrência de sintomas ou limitações, conforme o critério adotado no estudo. O instrumento contempla satisfação, número de refeições, ingestão de diferentes consistências, restrições, vômitos e regurgitação.

A eficiência mastigatória foi analisada por meio de protocolo clínico adaptado, utilizando carne bovina como alimento-teste, por fazer parte da alimentação habitual e apresentar uma consistência que pode estar relacionada a dificuldades alimentares no período pós-operatório. Para o procedimento, foram utilizados bifes preparados de patinho com espessura de 5 a 8 mm, previamente amaciados, temperados e correspondentes à consistência 7, classificada como “fácil de mastigar”, conforme a Iniciativa Internacional de Padronização de Dietas para Disfagia (IDDSI) (IDDSI, [s. d.])

Foram utilizadas peneiras com aberturas de 4,75 mm, 4,0 mm e 2,0 mm, além de uma base. Na primeira amostra, registraram-se o tempo e o número de ciclos da mastigação habitual. Antes da deglutição, o material foi expelido, lavado por 60 segundos e submetido à análise granulométrica, considerando as partículas retidas em cada peneira.

Outras amostras foram mastigadas por 10, 20 e 40 segundos, com contagem dos ciclos e repetição da análise. A eficiência foi classificada como ótima, boa, regular, ruim e péssima conforme o estágio em que se alcançou a fragmentação prevista no protocolo (VIANA, 2025).

O GI participou de dez sessões individuais semanais, com duração aproximada de 50 minutos. O programa foi estruturado com base nas alterações predominantes da avaliação inicial e em referências clínicas sobre reabilitação miofuncional. Foram realizados exercícios isométricos e isotônicos de língua, lábios e bochechas, mobilizações, massagens faciais, ajustes posturais, conscientização e treino funcional da mastigação e da deglutição (FELÍCIO, 1999; SALES; MOURÃO, 2020). Durante as atividades, foram monitoradas a execução, a fadiga muscular, a postura e a realização das atividades propostas.

O GC recebeu devolutiva da avaliação e orientações fonoaudiológicas impressas para realização domiciliar. A terapeuta permaneceu disponível durante dez semanas para esclarecer dúvidas. Após o período de acompanhamento,na 12ª semana, os dois grupos foram reavaliados. Em razão do tamanho reduzido da amostra, os dados foram analisados descritivamente, comparando-se os momentos inicial e final das mudanças observadas em cada grupo, sem realização de inferência estatística entre os grupos.

Resultados e Discussões

Na avaliação inicial, os resultados obtidos antes da intervenção demonstraram heterogeneidade entre as participantes quanto às alterações identificadas pelo protocolo MBGR. Os escores variaram entre 18 e 26 pontos, sendo P6 a participante com maior pontuação (26), enquanto P4 apresentou o menor resultado (18). P1 e P3 alcançaram 24 pontos, P2 totalizou 21 pontos e P5 e P7, 19 pontos cada. De modo geral, observou-se maior comprometimento dos aspectos relacionados ao tônus e à mobilidade das estruturas orofaciais, com ocorrência de hipotonia em diferentes regiões, incluindo lábios, bochechas, mento e língua. Também foram identificadas alterações na movimentação mandibular, indicando alterações miofuncionais em algumas participantes na avaliação inicial.

Esse perfil inicial é coerente com a caracterização de Godoy e Silva (2007), que já descreveram alterações miofuncionais em pessoas com obesidade mórbida antes da cirurgia, e com estudos que identificaram comprometimentos do sistema estomatognático nessa população (HUNGER MALEK-ZADEH et al., 2022; GUALDRÓN-BOBADILLA et al., 2022). Esses achados indicam que alterações miofuncionais podem estar presentes antes da realização da cirurgia bariátrica. Entretanto, como o presente estudo não realizou avaliação pré-operatória, não é possível determinar se as alterações identificadas já estavam presentes antes do procedimento cirúrgico.

A presença de hipotonia e mobilidade reduzida pode estar relacionada a alterações na mastigação. Conforme Douglas (2002) e Felício (1999), a eficiência dessa função depende da ação integrada de músculos e estruturas responsáveis pela movimentação

mandibular, pelo posicionamento do alimento e pela formação do bolo. Alterações no tônus e na mobilidade de língua e bochechas podem comprometer o posicionamento do alimento na região oclusal e sua adequada trituração.

Ao término do acompanhamento, verificou-se uma redução dos escores do MBGR em alguns participantes, com resultados finais entre 12 e 23 pontos. A maior variação foi observada em P2, que apresentou redução de 21 para 12 pontos, seguida por P6, cujo escore foi reduzido de 26 para 17 pontos, e P4, cuja pontuação diminuiu de 18 para 13. Alterações menores foram identificadas em P1 (24 para 23 pontos) e P7 (19 para 18). Em relação aos componentes avaliados, o grupo submetido à intervenção apresentou mudanças principalmente relacionadas ao tônus de língua e bochechas e à mobilidade de língua e lábios. Também foram observadas alterações nos aspectos funcionais da mastigação, envolvendo incisão, trituração e padrão mastigatório, bem como em componentes relacionados à deglutição. Entre as participantes que receberam apenas orientações fonoaudiológicas, as modificações observadas concentraram-se predominantemente nos aspectos mastigatórios e no ritmo da deglutição.

A redução dos escores indica menor ocorrência de alterações nos componentes avaliados pelo protocolo MBGR , mas deve ser interpretada com cautela. No GI, as participantes receberam acompanhamento individual durante as sessões, com supervisão da execução dos exercícios e adequação das atividades propostas. Esse tipo de supervisão é compatível com os princípios da terapia miofuncional descritos por Felício (1999), com as condutas relatadas por Sales e Mourão (2020) e com programas estruturados em outras condições clínicas (MIGLIORUCCI; PASSOS; BERRETIN-FELIX, 2017; SALINAS et al., 2025). Estudos recentes em outras populações também descrevem mudanças em parâmetros orofaciais após TMO, mas apresentam objetivos e condições clínicas diferentes e, portanto, oferecem apenas apoio indireto (LEAL et al., 2025; GÜZEL; TUNCER, 2025). Considerando o tamanho amostral e o delineamento do estudo, as mudanças observadas não podem ser atribuídas exclusivamente à TMO.

Na avaliação final, observou-se predomínio da classificação boa para a eficiência mastigatória, identificada em seis participantes, enquanto uma apresentou resultado regular. Entre as participantes do GI, quatro apresentaram mudança favorável na classificação da eficiência mastigatória: P1, P2 e P3 passaram de regular para boa, e P4 passou de péssima para boa. P5 permaneceu classificada como boa nos dois momentos. No GC, também foram observadas mudanças favoráveis: P6 passou de regular para boa e P7, de péssima para regular. Dessa forma, todas as participantes que apresentavam classificação inicial de eficiência mastigatória regular ou péssima demonstraram mudança favorável na avaliação final, independentemente do grupo ao qual pertenciam. A evolução individual dos resultados nas avaliações inicial e final está apresentada na Tabela 1.

A mudança observada em P4 coincidiu com o período de intervenção e foi acompanhada por modificações em componentes miofuncionais. Entretanto, diante do delineamento do estudo, não é possível atribuir exclusivamente à TMO a mudança da classificação de eficiência mastigatória. A fragmentação adequada do alimento é clinicamente relevante no pós-operatório bariátrico, no qual são recomendados pequenos volumes e mastigação cuidadosa para facilitar a tolerância dos alimentos. Orientações sobre ritmo, tamanho das porções e atenção à mastigação são recorrentes no acompanhamento dessa população (GODOY et al., 2023; SALES; MOURÃO,

2020). A ocorrência de mudanças favoráveis também nas duas participantes do GC reforça a necessidade de cautela na interpretação dos resultados. Além das orientações fonoaudiológicas recebidas por esse grupo, fatores relacionados ao próprio período pós-operatório e às características individuais podem ter contribuído para as mudanças observadas.

A análise granulométrica permitiu complementar a avaliação clínica por meio da análise do grau de fragmentação do alimento após a mastigação. A observação clínica identifica movimentos, postura, incisão e padrão mastigatório, enquanto a tamisação permite caracterizar a fragmentação do alimento de acordo com os critérios estabelecidos no protocolo utilizado. Dessa forma, foram obtidas informações clínicas e granulométricas sobre o desempenho mastigatório das participantes.

A distribuição das participantes de acordo com as categorias de eficiência mastigatória nos momentos inicial e final está apresentada na Figura 1, permitindo visualizar as mudanças observadas ao longo do acompanhamento.

Os resultados do Questionário Alimentar apresentaram escores finais superiores aos iniciais entre as participantes avaliadas nos dois momentos. Na avaliação final, P1, P2 e P6 apresentaram 25 pontos, enquanto P3 e P5 obtiveram 24 pontos e P4 e P7, 23 pontos. Na avaliação inicial, os escores registrados foram de 15 pontos para P1, 23 para P2, 16 para P5, 17 para P6 e 19 para P7, não havendo aplicação do instrumento para P3 e P4 nesse momento. As participantes que alcançaram 25 pontos relataram não apresentar mais sintomas de intolerância alimentar e demonstraram boa satisfação com a alimentação. Já entre aquelas que obtiveram 23 ou 24 pontos, permaneceram relatos de algumas limitações alimentares.

Esses dados aproximam-se da discussão proposta por Godoy et al. (2018), segundo a qual tolerância e comportamento alimentar devem ser acompanhados após o bypass gástrico em Y de Roux. O instrumento adaptado por Lomachinsky et al. (2024) permite registrar a perspectiva do paciente sobre a alimentação e complementa as medidas clínicas. Entretanto, P3 e P4 não responderam ao questionário na avaliação inicial, impossibilitando comparação individual entre os dois momentos para essas participantes. Entre aquelas com dados nos dois momentos, observaram-se escores finais superiores aos iniciais. Esses resultados não podem ser atribuídos exclusivamente à TMO, pois a tolerância alimentar pode ser influenciada pela evolução pós-operatória, pelo acompanhamento nutricional, por condições individuais e por mudanças alimentares simultâneas.

A comparação descritiva mostrou mudanças em diferentes parâmetros entre as participantes do grupo intervenção; entretanto, também foram observadas mudanças no grupo de comparação. Considerando o número reduzido e o desequilíbrio de participantes entre os grupos, esses resultados não permitem estabelecer diferenças entre GI e GC nem inferir superioridade da TMO. Relatos de atuação fonoaudiológica no contexto bariátrico defendem acompanhamento continuado, associado a orientações sobre mastigação e deglutição (SILVA; TANIGUTE; TESSITORE, 2014; SALES; MOURÃO, 2020; NASCIMENTO et al., 2023). A diferença numérica entre os grupos, a ausência de controle de potenciais fatores de confusão e o caráter descritivo da análise impedem comparações de efetividade.

Entre os aspectos que restringem a interpretação dos resultados, destaca-se o tamanho reduzido da amostra e a distribuição desigual das participantes entre os grupos. A condução das etapas de avaliação, intervenção e reavaliação por uma mesma pesquisadora, que também tinha conhecimento sobre a composição dos grupos, constitui outra possível fonte de viés de mensuração, devido à ausência de um avaliador independente. A diferença no período decorrido desde a cirurgia bariátrica entre as participantes também deve ser considerada, assim como a inexistência dos dados iniciais do Questionário Alimentar de duas participantes. Adicionalmente, a realização do teste de eficiência mastigatória em mais de um momento pode ter favorecido a familiarização das participantes com o procedimento. Em conjunto, essas condições podem ter influenciado os resultados e dificultam a extrapolação dos achados para outras populações.

Por se tratar de estudo piloto, os resultados devem ser compreendidos como preliminares e exploratórios. Pesquisas futuras devem incluir amostras maiores, grupos equilibrados, avaliadores independentes, padronização do tempo pós-operatório e acompanhamento longitudinal. Também é necessário controlar fatores nutricionais, odontológicos e comportamentais que possam interferir na mastigação e na tolerância alimentar. Essas medidas poderão contribuir para avaliar com maior precisão as mudanças na eficiência mastigatória associadas à TMO no período pós-cirurgia bariátrica.

Conclusão

Os achados deste estudo piloto mostraram mudanças favoráveis na eficiência mastigatória após o período de acompanhamento, observadas tanto entre participantes submetidas à Terapia Miofuncional Orofacial quanto entre aquelas que receberam orientações fonoaudiológicas. No grupo submetido à TMO, as mudanças foram acompanhadas por modificações em diferentes componentes miofuncionais orofaciais avaliados.

Entretanto, o reduzido tamanho amostral, o desequilíbrio entre os grupos, a ausência de avaliador independente e a incompletude de alguns dados iniciais limitam a interpretação dos resultados e não permitem atribuir as mudanças observadas à TMO ou estabelecer diferenças entre os grupos.

Dessa forma, os achados devem ser considerados preliminares e indicam a necessidade de estudos com amostras maiores, grupos mais equilibrados e maior controle metodológico para investigar as mudanças na eficiência mastigatória associadas à TMO no período pós-cirurgia bariátrica.

Referências

BOERLAGE, T. C. C. et al. Gastrointestinal symptoms before and after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass: a longitudinal assessment. Surgery for Obesity and Related Diseases, v. 15, n. 6, p. 871-877, 2019.

CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA. Resolução CFFa nº 717, de 15 de dezembro de 2023. Dispõe sobre a atuação do fonoaudiólogo na equipe multiprofissional de tratamento clínico da obesidade e de cirurgia bariátrica. Brasília, DF: CFFa, 2023.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia geral do sistema estomatognático. In: DOUGLAS, C. R. (org.). Tratado de fisiologia aplicada à fonoaudiologia. São Paulo: Robe Editorial, 2002. p. 289-302.

FELÍCIO, C. M. Fonoaudiologia aplicada a casos odontológicos. 1. ed. São Paulo: Lovise, 1999.

GODOY, C. M. A. et al. Food tolerance and eating behavior after Roux-en-Y gastric bypass surgery. Obesity Surgery, v. 28, n. 6, p. 1540-1545, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/s11695-017-2850-z.

GODOY, C. M. A.; LIMA, J. A.; BARRETO, L.; SILVA, T. E.; CAVALCANTI, R. V. A. Orientações importantes para uma melhor adaptação antes da cirurgia bariátrica. [S. l.]: Canva, 2023. Disponível em:https://www.canva.com/design/DAGIiFvKOxQ/LoPDmwUsOiAw0zVIt-u7wA/view. Acesso em: 26 jan. 2026.

GODOY, C. M. A.; SILVA, M. G. F. P. Caracterização miofuncional dos pacientes obesos mórbidos em preparo para cirurgia de obesidade mórbida. 2007. 28 f. Monografia (Especialização em Motricidade Orofacial) – Universidade Potiguar, Natal, 2007.

GUALDRÓN-BOBADILLA, G. F. et al. Stomatognathic system changes in obese patients undergoing bariatric surgery: a systematic review. Journal of Personalized Medicine, v. 12, n. 10, p. 1541, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/jpm12101541.

GÜZEL, H. C.; TUNCER, A. The efficacy of orofacial myofunctional therapy in oral dysphagia accompanying temporomandibular dysfunction. Cranio, v. 43, n. 4, p. 588-598, 2025. DOI: https://doi.org/10.1080/08869634.2023.2226832.

HUNGER MALEK-ZADEH, C. et al. Evaluation of stomatognathic system parameters after bariatric surgery. Obesity Surgery, v. 32, n. 2, p. 374-380, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/s11695-021-05774-3.

INTERNATIONAL DYSPHAGIA DIET STANDARDISATION INITIATIVE. The IDDSI framework. [S. l.]: IDDSI, [s. d.]. Disponível em:https://www.iddsi.org/. Acesso em: 29 ago. 2026.

LEAL, T. Y. et al. Brief orofacial myofunctional therapy and tongue pressure as prediction factors for open bite correction: a randomized clinical trial. Clinical Oral

Investigations, v. 29, n. 9, p. 407, 2025. DOI: https://doi.org/10.1007/s00784-025-06483-2.

LOMACHINSKY, M. C. Q.; SILVA, S. L.; GODOY, C. M. A.; FERNANDES JÚNIOR, F. A. M. Translation and cross-cultural adaptation of the 'Quality of alimentation' questionnaire to Brazilian Portuguese. CoDAS, v. 36, n. 4, e20230168, 2024. DOI: https://doi.org/10.1590/2317-1782/20242023168.

MIGLIORUCCI, R. R.; PASSOS, D. C. B. O. F.; BERRETIN-FELIX, G. Orofacial myofunctional therapy program for individuals undergoing orthognathic surgery. Revista CEFAC, v. 19, n. 2, p. 277-288, 2017. DOI: https://doi.org/10.1590/1982-021620171921317.

NASCIMENTO, Z. R. et al. Interdisciplinary experiences between speech therapy and dentistry in the pre and postoperative period for bariatric surgery. Journal of Diabetes, Metabolic Disorders & Control, v. 10, n. 2, p. 122-123, 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Obesidade. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde, 2023a. Disponível em:https://bvsms.saude.gov.br/obesidade/. Acesso em: 21 mar. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dia Mundial da Obesidade (04/03). Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde, 2023b. Disponível em:https://bvsms.saude.gov.br/dia-mundial-da-obesidade-04-3/. Acesso em: 21 mar. 2023.

PEREIRA, A. S. M. Versão reduzida do protocolo de avaliação miofuncional orofacial MBGR. 2023. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2023. DOI: https://doi.org/10.11606/T.25.2023.tde-29092023-112655.

REIS, A. L. C. R.; PALHARI, F. T. L.; SANTOS, T. S. Oral changes after bariatric surgery. Research, Society and Development, v. 13, n. 9, e0713946712, 2024. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v13i9.46712.

RUBINO, F. et al. Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. The Lancet Diabetes & Endocrinology, v. 13, n. 3, p. 221-262, 2025. DOI: https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00316-4.

SALES, M. R.; MOURÃO, Y. C. A. Atendimento fonoaudiológico no pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica em um hospital de referência. Revista Científica da Escola Estadual de Saúde Pública de Goiás Cândido Santiago, v. 6, n. 2, e600002, 2020.

SALINAS, P. C. et al. Myofunctional therapy in atypical swallowing: a scoping review. International Journal of Orofacial Myology and Myofunctional Therapy, v. 51, n. 2, p. 10, 2025. DOI:https://doi.org/10.3390/ijom51020010.

SANTOS, A. C.; SILVA, A. S. G.; GODOY, C. M. A. (org.). Cirurgia bariátrica e metabólica: abordagem multiprofissional. Rio de Janeiro: Rubio, 2019. 446 p.

SILVA, A. S. G.; TANIGUTE, C. C.; TESSITORE, A. The need for speech-language evaluation in the protocol for candidates for bariatric surgery. Revista CEFAC, São Paulo, v. 16, n. 5, p. 1655-1668, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA. Quem pode fazer cirurgia bariátrica. São Paulo, 2017. Disponível em:https://www.sbcbm.org.br/quem-pode-fazer-cirurgia-bariatrica/. Acesso em: 21 mar. 2023.

VIANA, I. S. Intervenção miofuncional orofacial em pacientes no período pós-cirurgia bariátrica: desenvolvimento e avaliação inicial de um estudo piloto com comparação. 2025. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fonoaudiologia) – Departamento de Fonoaudiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

Anexos



"Boa", "regular" e "péssima" correspondem às categorias de eficiência mastigatória previstas no protocolo utilizado no estudo.



número de participantes/avaliação inicial/avaliação final

CÓDIGO: SB1153

AUTOR: LUCAS DE QUEIROZ MENEZES

ORIENTADOR: NICOLE LEITE GALVAO COELHO

TÍTULO: Variações nos níveis séricos de cortisol em indivíduos com depressão resistente submetidos a intervenções com cetamina

Resumo

O transtorno depressivo maior resistente ao tratamento (DRT) é um desafio clínico associado a alterações nos níveis de cortisol, que podem estar elevados ou reduzidos. A cetamina subcutânea (SC) surge como alternativa terapêutica. Objetivo: Investigar o efeito da cetamina SC sobre os níveis séricos de cortisol em pacientes com DRT, testando se normaliza alterações hormonais sem alterar níveis normais. Metodologia: Ensaio clínico aberto com 26 pacientes tratados com cetamina SC por 8 semanas. Amostras de sangue foram coletadas na Semana 0 (baseline), Semana 4 e Semana 8. Com objetivo de explorar os dados, os participantes foram estratificados em normocortisolêmicos (n=18) e hipercortisolêmicos (n=7). As análises usaram Equações de Estimação Generalizadas (GEE) com distribuição Gaussiana inversa, avaliando efeitos do tempo e interação grupo x tempo, com comparações post-hoc pelo teste LSD. Resultados: Não houve efeito principal do tempo na amostra total ($Wald^2[2]=2,561$; $p=0,278$). Houve interação significativa entre tempo e grupo ($Wald^2[2]=11,941$; $p=0,003$). Na linha de base, os grupos diferiram (diferença média=18,66; $p<0,0001$). Normocortisolêmicos não mudaram significativamente, hipercortisolemia reduziu cortisol na Semana 8 (diferença média=-10,45; $p<0,0001$). Conclusão: A cetamina SC regula os níveis de cortisol, normalizando hipercortisolemia e mantendo normocortisolêmicos estáveis.

Palavras-chave: Depressão Resistente, Cetamina, Cortisol, Biomarcadores.

TITLE: Analysis of Serum Cortisol Levels in Patients with Treatment-Resistant Depression Undergoing Ketamine Therapy

Abstract

Treatment-resistant major depressive disorder (TRD) is a clinical challenge associated with alterations in cortisol levels, which can be elevated or reduced. Subcutaneous ketamine (SC) has emerged as a therapeutic alternative. Objective: To investigate the effect of SC ketamine on serum cortisol levels in patients with TRD, testing whether it normalizes hormonal alterations without affecting normal levels. Methods: An open-label clinical trial with 26 patients treated with SC ketamine for 8 weeks. Blood samples

were collected at Week 0 (baseline), Week 4, and Week 8. To explore the data, participants were stratified into normocortisolemic (n=18) and hypercortisolemic (n=7) groups. Analyses were performed using Generalized Estimating Equations (GEE) with an inverse Gaussian distribution, assessing the effects of time and the time × group interaction, with post-hoc comparisons conducted using the LSD test. Results: There was no main effect of time in the total sample (Wald²[2]=2.561; p=0.278). A significant time × group interaction was observed (Wald²[2]=11.941; p=0.003). At baseline, the groups differed (mean difference=18.66; p<0.0001). Normocortisolemic participants did not change significantly, whereas hypercortisolemic participants showed a reduction in cortisol at Week 8 (mean difference=-10.45; p<0.0001). Conclusion: SC ketamine regulates cortisol levels, normalizing hypercortisolemia while maintaining stability in normocortisolemic individuals.

Keywords: Treatment-Resistant Depression, Ketamine, Cortisol, Biomarkers

Introdução

1. Introdução O transtorno mental mais prevalente atualmente é a Depressão Maior (DM), afetando cerca de 300 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2021). Apesar das iniciativas de pesquisa voltadas para terapias farmacológicas seguras e eficazes, observa-se um aumento significativo da DM a cada geração, indicando desafios persistentes no diagnóstico e tratamento (Hidaka, 2012; Malhi & Mann, 2018). Cerca de um terço dos pacientes (Conway et al., 2017) não responde adequadamente aos antidepressivos disponíveis, indicando que mais de 30% não obtêm os resultados desejados com tratamentos padrão para o Transtorno Depressivo Maior. Uma explicação possível é que os antidepressivos tradicionais compartilham mecanismos de ação semelhantes, concentrados na regulação das monoaminas na sinalização neural, incluindo ISRS, IRSN, inibidores da recaptação de dopamina, entre outros (Otte et al., 2016; Rush et al., 2006). Diante desse cenário, tornou-se evidente, nas últimas duas décadas, a necessidade de explorar novas abordagens terapêuticas para o TDM que modifiquem diferentes mecanismos neurais e apresentem melhorias clínicas promissoras (Otte et al., 2016; Krystal et al., 2020). Evidências de ensaios clínicos destacam o potencial da cetamina no tratamento da depressão refratária às terapias convencionais (Zarate et al., 2006; Singh et al., 2016). Estudos demonstram a robustez desses resultados, como em ensaio clínico multicêntrico que utilizou placebo ativo com Midazolam, revelando redução significativa dos sintomas 24 horas após uma única dose intravenosa de cetamina, superando o placebo (Murrough et al., 2013a). Isso motivou a investigação da dose ideal, mostrando a superioridade de 0,5 mg/Kg e 1,0 mg/Kg intravenosos (Fava et al., 2018; Daly et al., 2019). A repetição da administração de cetamina pode sustentar melhorias nos sintomas ao longo do tempo, proporcionando efeitos clínicos mais pronunciados (Murrough et al., 2013b; Coyle & Laws, 2015; Phillips et al., 2019). No entanto, o impacto de múltiplas sessões ainda é pouco explorado. Quanto à fisiopatologia da depressão, biomarcadores como o cortisol desempenham papel crucial na regulação do estresse e da resposta a situações desafiadoras. Em pacientes com depressão maior, alterações nos níveis de cortisol são consistentes, incluindo disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), avanço ou atraso do ritmo circadiano e perturbação nos limites da faixa de cortisol (Pariante & Lightman, 2008; Stetler & Miller, 2011). Essas alterações são consideradas um estado da depressão maior, e não um traço, devido à dependência da fase da doença, duração e

gravidade. Mudanças nos níveis de cortisol podem ser um marcador importante no diagnóstico e tratamento da depressão. Além disso, o cortisol regula o sono, e distúrbios do sono são frequentes em pacientes com depressão (Nollet et al., 2020). A associação entre alterações nos níveis de cortisol, distúrbios do sono e depressão destaca a complexidade dessas interações e sua relevância clínica. Em resumo, a relação entre cortisol e depressão é multifacetada, envolvendo regulação do estresse e do sono, além de aspectos neurobiológicos e fisiológicos que influenciam o curso e gravidade da doença. Considerando que a cetamina é um tratamento promissor para TDM resistente, torna-se importante analisar possíveis correlações entre os níveis de cortisol e a resposta clínica. O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito da cetamina subcutânea e da psicoterapia assistida (PAC) nos níveis de cortisol em pacientes com DRT. A hipótese central é que a cetamina atue como reguladora dos níveis séricos de cortisol, restaurando a homeostase em pacientes com níveis altos ou baixos.

Metodologia

2. Metodologia 2.1 Participantes e Recrutamento Os pacientes foram identificados no ambulatório de depressão do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) e, posteriormente, encaminhados para participação no estudo clínico. Foram recrutados 26 indivíduos, com idades entre 18 e 65 anos, diagnosticados com depressão resistente ao tratamento (DRT), conforme indicação da equipe de psiquiatria do HUOL para realização da terapia com cetamina. Após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os participantes passaram por uma avaliação inicial para verificar a elegibilidade. Aqueles que atenderam aos critérios definidos tiveram sua primeira sessão agendada e foram orientados quanto à obrigatoriedade de comparecerem com um acompanhante. Todos os participantes elegíveis foram incluídos em um único grupo de intervenção, submetido ao protocolo de tratamento com cetamina subcutânea associada à psicoterapia assistida por cetamina (PAC). 2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão Foram incluídos no estudo pacientes com episódio depressivo atual de intensidade moderada a grave, persistente por no mínimo quatro semanas, e que já haviam utilizado pelo menos dois antidepressivos diferentes em doses e tempos considerados adequados. Foram excluídos indivíduos com condições clínicas que representassem risco no uso da cetamina, tais como hipertensão arterial não controlada, insuficiência cardíaca congestiva, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), obesidade grave, gravidez, hipertireoidismo, histórico de efeitos adversos graves com cetamina, ou comorbidades psiquiátricas como sintomas psicóticos ou transtorno de identidade dissociativo. 2.3 Desenho Experimental O estudo consistiu na aplicação de escalas clínicas em pacientes com DRT em tratamento com cetamina subcutânea associada à PAC. A triagem foi realizada por um psiquiatra da equipe do ambulatório de depressão do HUOL, durante consulta presencial, na qual foi aplicada a Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-5 (SCDI) para confirmar o diagnóstico. O protocolo de tratamento consistiu na administração semanal de cetamina subcutânea por oito semanas consecutivas. Em cada sessão, o paciente era recebido por um membro da equipe de pesquisa, que reforçava as informações sobre o procedimento. No dia da sessão, os pacientes estavam em jejum de sólidos por 4 horas e de líquidos por 2 horas. Além dos procedimentos já descritos, os pacientes passaram pelas três fases da psicoterapia assistida: Preparação, Experiência e Integração, com a primeira fase iniciando-se antes da primeira aplicação de cetamina. A fase de Preparação incluiu sessões de psicoeducação sobre os efeitos e significados possíveis da experiência com

cetamina. A fase de Experiência consistiu no acompanhamento psicológico durante o efeito agudo da substância, com estímulo à verbalização da vivência interna. A fase de Integração ocorreu em sessão não diretiva conduzida pelo mesmo psicoterapeuta, com o objetivo de explorar o significado subjetivo da experiência e auxiliar no manejo de possíveis desafios psicológicos emergentes. As coletas de materiais biológicos foram realizadas antes da primeira, quarta e oitava sessões. Foram realizadas dosagem de cortisol pelo Laboratório de Análises Clínicas do HUOL. Parte do sangue coletado foi enviado ao Laboratório de Medidas Hormonais (LMH) da UFRN para dosagem de BDNF. A substância utilizada foi a dextrocetamina, administrada inicialmente na dose de 0,5 mg/kg. Em caso de ausência de resposta, a segunda infusão foi realizada com 0,75 mg/kg, e as seguintes com até 1 mg/kg, respeitando a dose mínima eficaz identificada durante o escalonamento. 2.4 Analise estatística As análises foram realizadas utilizando o princípio de intenção de tratar (ITT). Todos os participantes foram analisados, independentemente de terem ou não desistido do tratamento. Para examinar o efeito do tempo no basal (S1), semana 4 (S4) e semana 8 (S8) do uso da cetamina em pacientes com DRT, foram aplicados A equação de estimação generalizada (GEE), seguida pelo teste post hoc LSD, foi utilizada para avaliar o efeito da interação grupo x tempo sobre o cortisol. O modelo GEE para cada desfecho foi baseado no ajuste de qualidade (goodness of fit). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo gráfico Q-Q normal. Nos casos em que foi observado a interação do tempo, seguimos as análises principais com testes post hoc de Diferença Mínima Significativa (LSD). Foram utilizados estimadores robustos para os efeitos fixos em casos de tamanhos amostrais pequenos e para modelos com pressupostos de distribuição violados. Os modelos GEE utilizaram a distribuição Gaussiana inversa, foram baseados na log-verossimilhança e usados para comparar modelos. Para explorar mais detalhadamente os dados, os participantes foram categorizados em três grupos com base nos níveis de cortisol: hipocortisolemia (<4,82 mcg/dL), cortisol normal (4,82–19,5 mcg/dL) e hipercortisolemia (>19,5 mcg/dL). O ponto de corte para os níveis de cortisol foi determinado com base em um estudo anterior que classificou os níveis de cortisol de acordo com os percentis 5% e 95% (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Alemanha). Com base nos valores de referência para cortisol normal, adotamos a seguinte classificação para os níveis de cortisol plasmático total: hipocortisolemia (EG-HOC, n = 1) cortisol normal (EG-CN, n = 18) e hipercortisolemia (EG-HC, n = 7). Devido ao pequeno tamanho amostral de participantes com hipocortisolemia, as análises estatísticas foram conduzidas apenas com os participantes com cortisol normal e hipercortisolemia.

Resultados e Discussões

3. Resultados 3.1 Mudanças nos níveis de cortisol sérico Na análise global, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de cortisol ao longo do tempo (S0, S4 e S8) [Wald²(2) = 2,561; p = 0,278]. 3.2 Mudanças nos níveis de cortisol sérico por subgrupos Foi observada uma interação significativa entre tempo e grupo (Wald²[2] = 11,941; p = 0,003), indicando que a variação dos níveis de cortisol ao longo do tempo diferiu entre os grupos de normocortisolemia e hipercortisolemia.Já na linha de base (Semana 0), participantes com normocortisolemia apresentavam níveis de cortisol significativamente mais baixos que aqueles com hipercortisolemia (diferença média = -18,66; p < 0,0001). Entre os participantes com cortisol normal na linha de base, não foram observadas alterações significativas ao longo do tratamento (S4 vs. S0: diferença

média = -10,02; p = 0,337; S8 vs. S0: diferença média = -40,87; p = 0,281). Por outro lado, no grupo com hipercortisolemia, a cetamina demonstrou efeito redutor sobre os níveis de cortisol sérico. A comparação entre S4 e S0 não atingiu significância estatística (diferença média = -9,23; p = 0,061), mas ao final do tratamento (S8), houve redução significativa em relação à linha de base (diferença média = -10,45; p < 0,0001). Na comparação entre grupos nos pontos pós-baseline, não foram observadas diferenças entre normo- e hipercortisolemia, tanto na Semana 4 (diferença média = 0,59; p = 0,955) quanto na Semana 8 (diferença média = 32,66; p = 0,386). 4. Discussões Este estudo representa uma terapia de baixo custo que é a cetamina subcutânea com a junção da psicoterapia para avaliar o seu potencial efeito sobre os níveis de cortisol sérico em pacientes com DRT.estratificados conforme seu estado basal de cortisol. A ausência de efeito principal do tempo na amostra total, acompanhada por uma interação significativa entre grupo e tempo, enfatiza a relevância tanto da análise estratificada quanto da consideração da heterogeneidade biológica na resposta ao tratamento. Os resultados demonstram que os efeitos da cetamina sobre o cortisol variam conforme o estado basal. Nos indivíduos normocortisolêmicos, observou-se manutenção da homeostase, sem alterações significativas nos níveis de cortisol — consistente com a hipótese de que a cetamina atua modulando disfunções, e não simplesmente suprimindo a atividade do cortisol. Esse achado está em consonância com estudos anteriores que registraram ausência de impacto significativo sobre o cortisol em indivíduos saudáveis após administração de cetamina em doses subanestésicas (KHALILI-MAHANI et al., 2015). Por outro lado, o grupo com hipercortisolemia apresentou uma redução acentuada e estatisticamente significativa nos níveis de cortisol, especialmente na Semana 8, o que é extremamente relevante — considerando que a hipercortisolemia crônica está implicada na fisiopatologia da depressão resistente e na disfunção do eixo HPA (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008; JURUENA et al., 2020). A convergência dos níveis de cortisol entre os grupos ao final do tratamento reforça o papel homeostático da cetamina nesse contexto. Um diferencial importante deste protocolo é a integração da psicoterapia assistida por cetamina (PAC/KAP), que combina os efeitos neurobiológicos da cetamina com a exploração psicológica e a integração da experiência terapêutica. Pesquisadores brasileiros, como Galvão-Coelho e colaboradores, têm contribuído de forma significativa para a compreensão da resposta ao estresse, da fisiologia do eixo HPA e dos efeitos da cetamina em contextos clínicos (GALVÃO-COELHO et al., 2015; GALVÃO-COELHO et al., 2021). Essa linha de investigação dá suporte à hipótese de que a PAC pode atuar de maneira sinérgica na modulação do estresse, potencializando a neuroplasticidade e os ganhos clínicos. Nesse sentido, revisões recentes também apontam que os mecanismos ativos da ketamine-assisted psychotherapy incluem alterações neurais temporárias, aumento da sinaptogênese e facilitação de insights terapêuticos (MALLOY-DAVIS et al., 2022; WOLFSON et al., 2022). Do ponto de vista mecanístico, os achados sustentam a hipótese de que a cetamina reduz o estresse alostático e facilita o retorno à normalidade do eixo HPA, possivelmente por meio de efeitos pró-plásticos e anti-inflamatórios, conforme descrito em estudos anteriores (ABDALLAH et al., 2018; KRYSTAL et al., 2019). Este estudo apresenta algumas limitações, como o tamanho amostral reduzido, desenho aberto, um único centro, estratificação assimétrica entre grupos e possibilidade de variabilidade residual relacionada a horário de coleta e dose individual. Ensaios randomizados, controlados por placebo, com amostras maiores e padronização rigorosa de coleta hormonal são necessários para replicar e estender estes achados, incluindo a avaliação conjunta de desfechos clínicos e mediadores do eixo HPA.

Conclusão

Conclusões A terapia com cetamina subcutânea, integrada à psicoterapia assistida (PAC), revelou um efeito regulador preciso sobre os níveis séricos de cortisol em pacientes com depressão resistente. O tratamento demonstrou uma ação dupla notável: promoveu a normalização da hipercortisolemia, um marcador biológico associado à refratariedade ao tratamento, ao mesmo tempo que preservou a estabilidade em pacientes cujos níveis de cortisol já estavam dentro da normalidade. Assim, este estudo contribui com evidências significativas para a compreensão dos mecanismos neuroendócrinos da cetamina, destacando seu potencial como moduladora da homeostase do eixo HPA.

Referências

Referências Beck AT, Steer RA, Brown GK. Manual for the Beck Depression Inventory-II. San Antonio, TX: Psychological Corporation; 1996. Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biological Psychiatry. 2000;47(4):351-354. Conway CR, George MS, Sackeim HA. A systematic review of evidence for the use of ketamine in the treatment of resistant depression. Annals of Clinical Psychiatry. 2017;29(1):44-57. Hidaka BH. Depression as a disease of modernity: explanations for increasing prevalence. Journal of Affective Disorders. 2012;140(3):205-214. Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, et al. Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. American Journal of Psychiatry. 2013;170(10):1134-1142. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. Archives of General Psychiatry. 2006;63(8):856-864. Krystal et al., 2019; Abdallah et al., 2018. The Neurobiology and Pharmacotherapy of Posttraumatic Stress Disorder GALVÃO-COELHO, N. L. et al. Social stress paradigms in animal models of depression: a systematic review of the literature. Neurobiology of Stress, v. 3, p. 111-118, 2015. GALVÃO-COELHO, N. L. et al. Ketamine and stress-related disorders: a systematic review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 120, p. 66-80, 2021. ABDALLAH, C. G. et al. The neurobiology and pharmacology of depression and resilience to stress: implications for novel therapeutics. Neurobiology of Stress, v. 9, p. 166-174, 2018. JURUENA, M. F. et al. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. Journal of Affective Disorders, v. 267, p. 172-182, 2020. KHALILI-MAHANI, N. et al. Cortisol modulates anticorrelated resting state networks in a dose-dependent manner. Psychoneuroendocrinology, v. 52, p. 231-240, 2015. MALLOY-DAVIS, J. et al. Active mechanisms of ketamine-assisted psychotherapy: A scoping review. Frontiers in Psychiatry, v. 13, p. 958195, 2022. WOLFSON, P. E. et al. Ketamine-assisted psychotherapy: expanding the therapeutic utility of ketamine. American Journal of Psychotherapy, v. 76, n. 1, p. 40-47, 2022.

CÓDIGO: SB1156

AUTOR: JOSE ARTHUR FELIPE PEQUENO

COAUTOR: HILDA RAIANNE SILVA DE MELO

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Inventário acústico da avifauna da Floresta Nacional de Açu, uma floresta tropical sazonalmente seca no Rio Grande do Norte, Brasil

Resumo

A bioacústica constitui uma ferramenta eficiente para o levantamento e monitoramento da biodiversidade, permitindo registrar espécies e avaliar aspectos ecológicos por meio de métodos acústicos passivos. Este estudo teve como objetivo realizar um inventário acústico da avifauna da Floresta Nacional (FLONA) de Açu, localizada no município de Assú, Rio Grande do Norte, Brasil. Foram selecionados 30 pontos de amostragem, distribuídos aleatoriamente pela unidade de conservação, com aproximadamente 500 m entre si. Utilizaram-se gravadores autônomos AudioMoth, configurados para registrar 15 minutos a cada hora, durante 24 horas, por cinco dias, entre janeiro e fevereiro de 2025. Foram registradas 69 espécies de aves, distribuídas em 13 ordens e 26 famílias, com destaque para Tyrannidae. Quanto à estrutura trófica, predominaram espécies insetívoras (42,03%), seguidas por onívoras (23,19%), granívoras (14,49%) e carnívoras (11,59%). Em relação à sensibilidade ambiental, 72,46% das espécies apresentaram baixa sensibilidade e 27,54%, média. Os resultados evidenciam o potencial da FLONA de Açu para a conservação da avifauna da Caatinga, destacando a importância do estudo como contribuição pioneira para o conhecimento da diversidade e dos aspectos ecológicos das aves na região.

Palavras-chave: Caatinga; Bioacústica; Conservação; Neotrópicos

TITLE: Acoustic Inventory of the Avifauna of the Açu National Forest, a Seasonally Dry Tropical Forest in Rio Grande do Norte, Brazil

Abstract

Bioacoustics is an efficient tool for biodiversity surveys and monitoring, enabling the recording of species and the assessment of ecological aspects through passive acoustic methods. This study aimed to conduct an acoustic inventory of the avifauna of Açu National Forest (FLONA), located in the municipality of Assú, Rio Grande do Norte,

Brazil. Thirty sampling points were randomly distributed throughout the protected area, with approximately 500 m between points. Autonomous AudioMoth recorders were used and configured to record 15 minutes every hour, continuously over 24 hours, for five days, between January and February 2025. A total of 69 bird species were recorded, distributed across 13 orders and 26 families, with Tyrannidae being the most representative family. Regarding trophic structure, insectivorous species predominated (42.03%), followed by omnivorous (23.19%), granivorous (14.49%), and carnivorous species (11.59%). Concerning environmental sensitivity, 72.46% of the species exhibited low sensitivity, while 27.54% showed medium sensitivity. These results highlight the potential of Açu National Forest for the conservation of Caatinga avifauna and emphasize the importance of this study as a pioneering contribution to the knowledge of bird diversity and ecological characteristics in the region.

Keywords: Caatinga; Bioacoustics; Conservation; Neotropics

Introdução

O estudo da biodiversidade por meio da bioacústica constitui uma ferramenta eficiente para o levantamento e monitoramento de espécies, bem como para a avaliação de processos ecológicos (Pijanowski, 2011; Farina & Pieretti, 2012). O uso de gravadores autônomos possibilita a aplicação do método acústico passivo (MAP), caracterizado por ser não invasivo e por minimizar possíveis alterações no comportamento vocal dos indivíduos (Blumstein et al., 2011; Shonfield et al., 2017). Além disso, a utilização simultânea de múltiplos equipamentos permite uma amostragem mais homogênea da área, contemplando diferentes fitofisionomias e micro-habitats, tanto no período diurno quanto noturno, sendo especialmente útil em estudos de avifauna (Hill et al., 2018; de Aguiar-Silva et al., 2022; Sobroza et al., 2025).

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades de aves do mundo, com aproximadamente 1.971 espécies reconhecidas pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2025), representando cerca de 17% da avifauna mundial (Rocha-Lima, 2020; Moraes, 2022). Essa elevada riqueza está relacionada à diversidade de biomas brasileiros, que apresentam distintas condições ambientais e contribuem para a diversificação das comunidades de aves (Oliveira et al., 2016).

Entre esses biomas, a Caatinga destaca-se por sua elevada riqueza e por constituir um importante centro de endemismo para aves sul-americanas. Apesar disso, permanece entre os ecossistemas brasileiros mais ameaçados pela ação antrópica (Cracraft, 1985; Prado & Gibbs, 1993; Castelletti et al., 2003; Azevedo-Junior et al., 2023). Historicamente, o bioma foi considerado pobre em biodiversidade devido às suas condições climáticas, caracterizadas por períodos prolongados de seca, elevadas temperaturas e baixos índices pluviométricos (Andrade-Lima, 1982). Entretanto, estudos posteriores evidenciaram sua relevância biológica e a necessidade de ampliar o conhecimento sobre sua biodiversidade.

Apesar do aumento das pesquisas sobre a Caatinga, o conhecimento sobre sua avifauna ainda é inferior ao de outros biomas brasileiros, enquanto a perda de vegetação nativa

intensifica a necessidade de estudos voltados à sua conservação (Pacheco, 2004; Azevedo-Junior et al., 2023). Nesse contexto, a Floresta Nacional de Açu (FLONA), uma das cinco Florestas Nacionais inseridas no bioma Caatinga e a única localizada no Rio Grande do Norte, apresenta relevância para o conhecimento e conservação da biodiversidade regional. Entretanto, ainda são escassos os estudos específicos sobre sua avifauna. Para o município de Assú, destaca-se a publicação "Sertão Onde a Vida Versa: A Biodiversidade de Assú-RN", que registra aproximadamente 170 espécies de aves (Schimitt-Jr et al., 2025), evidenciando a riqueza regional e a importância da ampliação dos inventários biológicos.

O conhecimento sobre a composição e distribuição das espécies é fundamental para subsidiar estratégias de conservação, manejo e monitoramento, especialmente em unidades de conservação (Miranda & Anjos, 2022). O Plano de Ação Nacional para a Conservação das Aves da Caatinga também destaca a identificação de áreas estratégicas como uma ação prioritária para a conservação das espécies (ICMBio, 2019). Dessa forma, este estudo teve como objetivo inventariar a avifauna da Floresta Nacional de Açu por meio de monitoramento acústico com gravadores autônomos, contribuindo para o conhecimento da diversidade de aves e para o planejamento de estratégias de conservação na região.

Metodologia

Área de estudo

O estudofoi conduzido na Floresta Nacional (FLONA) de Açú, uma Unidade de Conservação de categoria de Uso Sustentável,localizada no município de Assú no estado Rio Grande do Norte, Brasil (5° 32' 8" S e 36° 56' 02" O).Possui uma área total de 225,02 hectares de bioma Caatinga (ICMBio, 2019), está na margem da bacia sedimentar potiguar possuindo solos pedregosos e com seixos rolados característico da área, onde o clima da região é classificado como semiárido quente do tipo BShde acordo com a classificação climática de Köppen (ALVARES et al., 2013), a temperatura média anual de aproximadamente 28,3 °C, (INMET, 2022). A precipitação acumulada do munícipio no ano de 2025 foi de 495,7 mm (EMPARN, 2026).A vegetação é composta por quatro- grupos vegetacionais característicos: Caatinga-arbustiva, Caatinga arbustivo-arbórea, Caatinga gramíneo-arbustiva e a Caatinga herbáceo-arbustiva (LOPES-NUNES et al., 2020).

Coleta de dados

Para a amostragem selecionamos30 pontos aleatorizados de forma que contemplasse todas as áreas da Flona, onde por georreferenciamento foramdelimitados cada um com cerca de 500 metros de distância entre si. Em cada ponto foramutilizadosgravadoresautônomos do tipo AudioMoth, configurados para gravar 15 minutos durante 24 horas em cinco dias. As coletas foram realizadas entre 07 de janeiroa07 de fevereiro de 2025.As gravações obtidas durante a amostragem foram armazenadas na plataforma web RFCxArbimon, onde os arquivos de som podem ser armazenados e investigados.

Dado o volume de gravações geradas uma avaliação e análise manuaisse tornam inviáveis de serem realizadas, dessa forma adotamos um fluxo de trabalho com identificação semiautomática de espécies com o uso do Arbimon, a partir dos espectrogramas gerados pela Arbimon, inspecionamos manualmente as gravações para buscar sinais vocais da espécie e validarmosse aespécie estava presente em cada registro gerado pelo arbimon. Durante esse processo,foram identificados e selecionadostemplates como modelos para análises de correspondência de modelos, conhecidas como análise de PatternMatching (PM) no sistema RFCxArbimon. A lista de espécies seguiu o padrão de nomenclatura em acordo com o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) 2025.

Guildas tróficas

As comunidades de aves possuem guildas tróficas que foram determinadas com base em dados obtidos na literatura específica para o grupo, trabalhos comoMotta-Júnior (1990), Sick (1997), Donatelli et al., (2004) e Telino-Júnior et al., (2005). Neste trabalho as categorias tróficas consideradas foram: Insetívoros (INS) - alimentação baseada na captura de insetos no solo, no ar ou entre galhos; Carnívoros (C) -alimentação composta por grandes insetos, pequenos e grandes invertebrados; Frugívoros (FRU) - alimentação principalmente composta por frutos; Nectarivoros (NEC) - alimentação baseada principalmente em néctar; Necrófagos (Nf) - alimentação composta em animais mortos; Onívoros (ONI) - alimentação composta por artrópodes, pequenos invertebrados e frutos; Granívoros (GRA) - Alimentação baseada na predação de sementes; Fitófagos (FIT) - Alimentação baseada na predação de material vegetal como folhas, flores e brotos; Piscívoros (PIS) - alimentação composta por peixes.

Sensibilidade

As espécies registradas no presente estudo também foram classificadas quanto ao grau de sensibilidade aos impactos causados pelas atividades humanas, de acordo com três categorias: (1) sensibilidade alta, (2) sensibilidade média e (3) sensibilidade baixa. Essa classificação foi baseada em Stotz et al., (1996).

Espécies ameaçadas de extinção

Para a classificação das espécies ameaçadas de extinção, foram consideradas as categorias estabelecidas pela Lista de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Norte(IDEMA, 2025), que incluem: “Vulnerável” (VU), “Em Perigo” (EN), “Criticamente em Perigo” (CR) e “Extinta na Natureza” (EW). Dessa forma, foram consideradas ameaçadas as espécies enquadradas em qualquer uma dessas categorias, conforme os critérios adotados na referida lista.

Resultados e Discussões

Como resultadosregistramos 69 espécies de aves na área estudada, das quais estão distribuídas em 13 ordens e26 famílias distintas, sendo 11 famílias (42,31%) da ordem

passeriformes e 15(57,69%) não-passeriformes. Dentro da ordem passeriformes se destacam as famílias Tyrannidae (12 spp.), Thamnophilidae (5 spp.), Dendrocolaptidae (3 spp.) eTurdidae(3 spp.). Já na ordem dos não-passeriformes as famílias com maior parcela na riqueza total foramColumbidae (6 spp.), Cuculidae (6 spp.), Anatidade (3 spp.) e Tinamidae (3 spp.) (Tabela 1, Fig. 1).

Tabela 1 – Lista de espécies registradas na Floresta Nacional de Açu, Açu, Rio Grande do Norte, Brasil.famílias, guildas tróficas e categoria de sensibilidade. Guildas tróficas (INS) Insetívoro, (ONI) Onívoro, (FRU) Frugívoro, (C) Carnívoro, (GRA) Granívoro, (NEC)Nectarívoro, (Nf) Necrófago, (FIT)Fitófagose (P) Piscívoro. Grau de Sensibilidade (A) Alto, (M) Médio e (B) Baixo. Grau de Ameaça (LC) Pouco preocupante e (VU) Vulnerável.

Família

Espécie

Guilda

Sensibilidade

Status de Conservação

Tinamidae

Crypturellusparvirostris

GRA

B

LC

Tinamidae

Crypturellustataupa

GRA

B

LC

Tinamidae

Nothura maculosa

GRA

B

LC

Anatidae

Amazonetta brasiliensis

FIT

B

LC

Anatidae

Dendrocygna autumnalis

FIT

B

LC

Anatidae

Dendrocygna viduata

FIT

B

LC

Cariamidae

Cariama cristata

C

B

LC

Columbidae

Columbina minuta

GRA

B

LC

Columbidae

Columbina picui

GRA

B

LC

Columbidae

Columbina talpacoti

GRA

B

LC

Columbidae

Leptotilaverreauxi

GRA

B

LC

Columbidae

Patagioenaspicazuro

GRA

M

LC

Columbidae

Zenaidaauriculata

GRA

B

LC

Cuculidae

Coccyzusmelacoryphus

INS

B

LC

Cuculidae

Crotophagaani

ONI

B

LC

Cuculidae

Crotophaga major

C

M

LC

Cuculidae

Guira guira

C

B

LC

Cuculidae

Piaya cayana

ONI

B

LC

Cuculidae

Tapera naevia

INS

B

LC

Caprimulgidae

Nyctidromus albicollis

INS

B

LC

Caprimulgidae

Setopagisparvula

INS

B

LC

Rallidae

Gallinulagaleata

FIT

B

LC

Tytonidae

Tytofurcata

C

B

LC

Strigidae

Asioclamator

C

B

LC

Strigidae

Glaucidiumbrasilianum

C

B

LC

Strigidae

Megascopscholiba

C

B

LC

Bucconidae

Nystalusmaculatus

C

M

LC

Picidae

Piculuschrysochloros

INS

M

LC

Picidae

Picumnuslimae

INS

M

LC

Picidae

Veniliornispasserinus

INS

B

LC

Falconidae

Caracaraplancus

ONI

B

LC

Psittacidae

Eupsittulacactorum

FRU

M

LC

Psittacidae

Forpusxanthopterygius

FRU

B

LC

Thamnophilidae

Formicivora melanogaster

INS

M

LC

Thamnophilidae

Myrmorchilusstrigilatus

INS

M

LC

Thamnophilidae

Sakesphorusniedeguidoneae

INS

M

LC

Thamnophilidae

Taraba major

ONI

B

LC

Thamnophilidae

Thamnophiluscapistratus

ONI

B

LC

Furnariidae

Furnariusfigulus

INS

B

LC

Furnariidae

Pseudoseisura cristata

INS

M

LC

Dendrocolaptidae

Camphyloramphustrochilirostris

INS

M

VU

Dendrocolaptidae

Lepidocolaptesangustirostris

INS

M

LC

Dendrocolaptidae

Sittasomusgriseicapillus

INS

M

LC

Tyrannidae

Camptostomaobsoletum

INS

B

LC

Tyrannidae

Elaeniaflavogaster

INS

B

LC

Tyrannidae

Euscarthmusmeloryphus

INS

B

LC

Tyrannidae

Hemitriccusmargaritaceiventer

INS

M

LC

Tyrannidae

Myiarchustyrannulus

INS

B

LC

Tyrannidae

Myiodynastesmaculatus

ONI

B

LC

Tyrannidae

Myiopagisviridicata

INS

M

LC

Tyrannidae

Myiozetetes similis

INS

B

LC

Tyrannidae

Pitangus sulphuratus

ONI

B

LC

Tyrannidae

Todirostrumcinereum

INS

B

LC

Tyrannidae

Tolmomyiasflaviventris

INS

B

LC

Tyrannidae

Tyrannusmelancholicus

INS

B

LC

Tityridae

Pachyramphuspolychopterus

INS

B

LC

Tityridae

Pachyramphusvalidus

INS

M

LC

Vireonidae

Cyclarhisgujanensis

ONI

B

LC

Vireonidae

Hylophilusamaurocephalus

ONI

M

LC

Vireonidae

Vireochivi

INS

B

LC

Corvidae

Cyanocoraxcyanopogon

ONI

M

LC

Troglodytidae

Cantorchiluslongirostris

INS

B

LC

Mimidae

Mimus saturninus

ONI

B

LC

Turdidae

Turdusamaurochalinus

ONI

B

LC

Turdidae

Turdusleucomelas

ONI

B

LC

Turdidae

Turdusrufiventris

ONI

B

LC

Icteridae

Icterusjamacaii

ONI

B

LC

Cardinalidae

Cyanoloxiabrissonii

ONI

M

VU

Figura 1. Prancha de espécies registradas durante o estudo na Floresta Nacional de Açu, Assú, Rio Grande do Norte, Brasil. (A) Nystalusmaculatus, (B) Sakesphoroidesniedeguidoneae(C) Piaya cayana (D) Thamnophiluscapistratus(E) Veniliornispasserinus(F) Taraba major (G)Icterusjamacaii(H) Crotophaga major (I) Caracaraplancus.

Observa-se uma maior representatividade da família Tyrannidae nesta pesquisa, resultado que corrobora com a literatura de trabalhos anteriores realizados por Melo-Júnior et al., (2001), Santos (2004), Pacheco; Olmos, (2006),Las-Casas et al., (2012), Santos et al., (2004), Pereira et al., (2014), Mariano e Martins (2017), Silva e Nogueira (2024)e Santos Neto et al., (2025). De acordo com os trabalhos de Traylor; Fitzpatrick (1982); Silva (1995); Cintra (1997) a família Tyrannidae é a que tem o maior número de espécies devido às suas grandes variações morfológicas e comportamentais que conferem uma maior capacidade de ocupação e adaptação a diferentes ambientes, como as diferentes fitofisionomias encontradas dentro da FLONA de Assú (Figura 1).

Figura 2:Riqueza das famílias de aves registradas na FLONA de Açú, Município de Assú, Rio Grande do Norte, durante 7 de janeiro a 7 de fevereiro de 2025.

Os ecossistemas possuem uma estrutura trófica que é organizada a partir de uma comunidade baseada nas relações de alimentação das populações, resultando da forma com que as espécies exploram os recursos disponíveis, determinando o fluxo de energia dentro dos ecossistemas (MacArthur, 1972; Ricklefs, 2010). Trabalhos avaliando a estrutura trófica das comunidades de aves ainda são escassos, sobretudo na região semiárida do Nordeste, com estudos voltados para a mata atlântica.

Acerca da estrutura trófica da avifauna presente na FLONA de Açú foi observado que houve um predomínio de espécies insetívoras (29 spp.; 42,03%), seguidas de onívoras (16 spp.; 23,19%), granívoras (10 spp. 14,49%) e carnívora (8 spp.; 11,59%). As guildas tróficas menos representativas foram as guildas: fitófagas (4 spp.; 5,80%) e frugíivoras (2 spp.; 2,90%). Neste trabalho não foram encontradas espécies nectarívoras, piscívorase necrófagas (Figura3).

Figura 3. Categorias tróficas das aves registradas na FLONA de Açú, Município de Assú, Rio Grande do Norte, durante 7 de janeiro a 7 de fevereiro de 2025.

As guildas tróficas insetívora e onívora foram as mais representativas neste trabalho que juntas representam 45 espécies (65,22% do total observado), o que vai de acordo com os resultados encontrados nos trabalhos de outros autores (Las-Casas et al., 2012; Ruiz-Esparza et al., 2012;Santos Neto et al., 2025). Esses estudos demonstram uma alta porcentagem de espécies insetívoras, o que se enquadra no padrão observado para a região tropical. Tais resultados são esperados, tendo em vista que os insetos se caracterizam como um recurso abundante e disponível durante todo o ano (Donatelli et al., 2004). Entretando o percentual de espécies onívoras pode ser indicativo de áreas alteradas como demostrado por Dario (2008), visto que espécies onívorascomo Pitangus sulphuratus, CrotophagaanieTurdusrufiventrisapresentam uma maior plasticidade no que diz respeito aos efeitos causados por ações antrópicas em paisagens com algum nível de alteração como na FLONA de Açú.

A respeito do nível de sensibilidade as alterações do ambiente apresentado pelas espécies registradas no trabalho, foi evidenciado uma predominância significativa de espécies com sensibilidade baixa (50 spp.) representando mais da metade das espécies totais(72,46%), seguidas das espécies consideradas com nível de sensibilidade média (19 spp.) representando a menor parcela das espécies totais (27,54%), não houve registros de espécies categorizadas com nível de sensibilidade alta (Figura 4).Entretanto, duas espécies estão classificadas com grau de ameaça Vulnerável (VU) pela Lista Oficial da Fauna Ameaçada Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Norte (RIO GRANDE DO NORTE, 2026), sendo elas: Cyanoloxiabrisoniie Camphylorhampustrochilirostris.

Fonte: Autoria própria

Figura 4. Nível de sensibilidade das espécies de aves da FLONA de Açú, Município de Assú, Rio Grande do Norte, durante 7 de janeiro a 7 de fevereiro de 2025.

A área estudada sofre com consideráveis impactos ambientais causados pela interferência humana, isso ocorre devido à proximidade com a área urbana, sendo margeado em alguns pontos por moradias, o que resulta na pressão ao ecossistema pelo descarte de lixo inadequado, caça e incêndios como citado no Plano de Manejo da Unidade de conservação (ICMBio, 2020). Essas características do ambiente podem estar relacionadas com a predominância de espécies com médio e baixo grau de sensibilidade.

No Plano de Manejo há apenas a citação de três espécies de aves, sendo elas: arapaçu-do-nordeste (Xiphocolaptesfalcirostris), Pica-pau-anão-da-caatinga (Picumnuslimae) e sebinho-de-olho-de-ouro (Hemitriccusmargaritaceiventer), o que demostra o grau de importância deste trabalho, subsidiando o aumento do conhecimento ecológico, taxonômico e da biodiversidade, sobretudo para o fomento de estratégias de conservação deste grupo e de ações de educação ambiental.

Conclusão

A Floresta Nacional de Açú (FLONA de Açú) apresenta relevante potencial para a conservação da avifauna da Caatinga, especialmente de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. A diversidade de fitofisionomias e a presença de diferentes micro-habitats proporcionam condições e recursos importantes para a manutenção da riqueza e da composição da comunidade de aves, reforçando a importância da unidade de conservação para a proteção da biodiversidade regional.

Os resultados deste estudo contribuem para ampliar o conhecimento sobre a avifauna da FLONA de Açú, fornecendo informações sobre sua riqueza, composição e ocorrência de espécies com diferentes níveis de sensibilidade e categorias de ameaça. Considerando a ausência de estudos anteriores com esse enfoque específico na unidade, este trabalho constitui uma importante contribuição inicial para o conhecimento da

comunidade de aves e pode servir como base para pesquisas futuras e para o planejamento de ações de conservação e manejo.

Por fim, destaca-se a necessidade de monitoramentos contínuos e de longo prazo na FLONA de Açú, com a ampliação do esforço amostral e a realização de levantamentos em diferentes períodos sazonais. A continuidade das pesquisas permitirá uma caracterização mais abrangente da diversidade de aves da unidade, contribuindo para a identificação de mudanças na composição da comunidade, o acompanhamento de espécies ameaçadas e a definição de estratégias mais efetivas para a conservação da avifauna e dos ambientes naturais protegidos pela unidade.

Referências

ALMEIDA, M. E. C. Estrutura de comunidades de aves em áreas de Cerrado da região nordeste do Estado de São Paulo. 2003. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. de M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

ANDRADE-LIMA, D. Present-day forest refuges in northeastern Brazil. In: PRANCE, G. T. (ed.). Biological Diversification in the Tropics. New York: Columbia University Press, 1982. p. 245–251.

AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. de et al. Estado da arte do conhecimento da avifauna da Caatinga. Journal of Environmental Analysis and Progress, v. 8, n. 2, p. 110–122, 2023.

BLUMSTEIN, D. T. et al. Acoustic monitoring in terrestrial environments using microphone arrays: applications, technological considerations and prospectus. Journal of Applied Ecology, v. 48, n. 3, p. 758–767, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas na Caatinga – PPCaatinga. Brasília, DF: MMA, 2024.

CASTELLETTI, C. H. M.; SANTOS, A. M. M.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (ed.). Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003. p. 719–734.

CINTRA, R. Spatial distribution and foraging tactics of tyrant flycatchers in two habitats in the Brazilian Amazon. Studies on Neotropical Fauna and Environment, v. 32, n. 1, p. 17–27, 1997.

CRACRAFT, J. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. Ornithological Monographs, n. 36, p. 49–84, 1985.

DARIO, F. R. Estrutura trófica da avifauna em fragmentos florestais na Amazônia Oriental. ConScientiae Saúde, v. 7, n. 2, p. 169–180, 2008.

DONATELLI, R. J.; COSTA, T. V. V.; FERREIRA, C. D. Dinâmica da avifauna em fragmento de mata na Fazenda Rio Claro, Lençóis Paulista, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 21, n. 1, p. 97–114, 2004.

FARINA, A.; PIERETTI, N. The soundscape ecology: a new frontier of landscape research and its application to islands and coastal systems. Journal of Marine and Island Cultures, v. 1, n. 1, p. 21–26, 2012.

FERRI, M. G. A vegetação brasileira. São Paulo: Editora Itatiaia/EDUSP, 1980.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Floresta Nacional de Açu. Brasília, DF: ICMBio, 2019.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Plano de Ação Nacional para a Conservação das Aves da Caatinga: sumário executivo – 2º ciclo. Brasília, DF: ICMBio, 2019.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Plano de manejo da Floresta Nacional de Açu. Brasília, DF: ICMBio, 2020.

LAS-CASAS, F. M. G.; SOUSA JÚNIOR, S. C.; DIAS, M.; BIANCHI, C. A. Community structure and bird species composition in a Caatinga of Pernambuco, Brazil. Revista Brasileira de Ornitologia, v. 20, n. 3, p. 251–262, 2012.

LOPES-NUNES, A. L. S.; HOLANDA, A. C. de; COSTA, M. do P.; NUNES, L. J.; COSTA, E. J. P. da. Florística e diversidade da regeneração natural na Floresta Nacional de Açú, em Assú/RN. [S. l.: s. n.], 2020.

MACARTHUR, R. H. Geographical Ecology: patterns in the distribution of species. Princeton: Princeton University Press, 1972.

MARIANO, E. F.; MARTINS, L. R. A. Bird species richness at Parque Estadual do Pico do Jabre, Paraíba. Acta Brasiliensis, v. 1, n. 2, p. 19–23, 2017.

MARTINS, M.; AQUINO, E. A.; ALBUQUERQUE, L. B. Guildas tróficas da avifauna na Lagoa Itatiaia, Campo Grande, MS. Multitemas, Campo Grande, n. 35, p. 111–131, 2016.

MELO-JÚNIOR, T. A. et al. Bird species distribution and conservation in Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. Bird Conservation International, v. 11, n. 3, p. 189–204, 2001.

OLIVEIRA, U. et al. Patterns of vertebrate diversity and protection in Brazil. PLoS ONE, v. 11, n. 12, e0145064, 2016.

PACHECO, J. F. A ornitologia descobre o sertão: um balanço do conhecimento da avifauna da Caatinga dos primórdios aos anos 1950. In: STRAUBE, F. C. (ed.). Ornitologia Brasileira no século XX. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ornitologia, 2000. p. 11–70.

PACHECO, J. F. As aves da Caatinga: uma análise histórica do conhecimento. In: SILVA, J. M. C. et al. (ed.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para conservação. Brasília, DF: MMA, 2004. p. 189–250.

PACHECO, J. F.; OLMOS, F. As aves do Tocantins 1: Região Sudeste. Revista Brasileira de Ornitologia, v. 14, n. 2, p. 85–100, 2006.

PAIVA, C. D. G.; MORO, M. F.; SOUSA, L. de O. F. de; BALDAUF, C. Fitossociologia da caatinga na Floresta Nacional de Açu, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e entorno: diversidade e biogeografia do componente lenhoso. Hoehnea, v. 48, e812020, 2021.

PEREIRA, G. A.; MEDCRAFT, J.; SANTOS, S. S. dos; FONSECA NETO, F. P. da. Riqueza e conservação de aves em cinco áreas de caatinga no nordeste do Brasil. Cotinga, v. 36, p. 16–26, 2014.

PIJANOWSKI, B. C.; FARINA, A.; GAGE, S. H.; DUMYAHN, S. L.; KRAUSE, B. L. What is soundscape ecology? An introduction and overview of an emerging new science. Landscape Ecology, v. 26, n. 9, p. 1213–1232, 2011.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 80, n. 4, p. 902–927, 1993.

RICKLEFS, R. E. A Economia da Natureza. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RIO GRANDE DO NORTE. Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente. Portaria-SEI nº 52, de 22 de janeiro de 2026. Institui a Lista Oficial das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Norte. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Norte, Natal, ano XCIII, n. 16.082, 28 jan. 2026.

ROSA, J. S. da; FRANCALACI, A.; ROCHA-LIMA, A. B. C. Levantamento da avifauna em uma área particular no município de Jundiaí-SP. UNISANTA Bioscience, v. 9, n. 4, p. 292–300, 2020.

RUIZ-ESPARZA, J.; ROCHA, P. A.; RIBEIRO, A. S.; FERRARI, S. F. The birds of the Serra da Guia in the caatinga of northern Sergipe. Revista Brasileira de Ornitologia, v. 20, n. 3, p. 291–301, 2012.

SANTOS, M. P. D. As comunidades de aves em duas fisionomias da vegetação de Caatinga no estado do Piauí, Brasil. Ararajuba, v. 12, n. 2, p. 113–123, 2004.

SANTOS NETO, A. S. da; RUIZ-ESPARZA, J. M.; CARNELOSSI, E. A. G. Aves em áreas de Caatinga em diferentes estádios de sucessão. Revista Brasileira de Meio Ambiente, v. 13, n. 2, p. 32–50, 2025.

SCHMITT-JR, A. A. et al. Sertão Onde a Vida Versa: A Biodiversidade de Assú-RN. 1. ed. Assú, RN: Edição Independente, 2025.

SHONFIELD, J.; BAYNE, E. M. Autonomous recording units in avian ecological research: current use and future applications. Avian Conservation and Ecology, v. 12, n. 1, art. 14, 2017.

SILVA, J. M. C. Birds of the Cerrado Region South America. Steenstrupia, v. 21, p. 69–92, 1995.

STOTZ, D. F. et al. Neotropical Birds: ecology and conservation. Chicago: University of Chicago Press, 1996.

SUEUR, J.; FARINA, A. Ecoacoustics: the ecological investigation and interpretation of environmental sound. Biosemiotics, v. 8, n. 3, p. 493–502, 2015.

TELINO-JÚNIOR, W. R.; LYRA-NEVES, R. M. de; NASCIMENTO, J. L. X. do. Biologia e composição da avifauna em uma Reserva Particular de Patrimônio Natural da caatinga paraibana. Melopsittacus, v. 3, n. 1, p. 12–35, 2004.

TRAYLOR, M. A.; FITZPATRICK, J. A. Survey of tyrant flycatchers. Living Bird, v. 19, p. 7–50, 1982.

VIEIRA, F. M. et al. Estrutura trófica da avifauna de quatro fitofisionomias de Cerrado no Parque Estadual da Serra Azul. Ornithologia, v. 5, n. 2, p. 43–57, 2013.

Anexos



Riqueza de espécies por família



Guildas tróficas



Gráfico de sensibilidade



Pranhca de espécies registradas

CÓDIGO: SB1181

AUTOR: LETICIA LIMA REI RAMOS E SILVA

ORIENTADOR: SERGIO ADRIANE BEZERRA DE MOURA

TÍTULO: Análise da ocorrência de anomalias em dentes humanos no Biobanco de Dentes Humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Resumo

Introdução: Dentes utilizados em ensino e pesquisa devem ser provenientes de Biobancos de Dentes Humanos (BDH), conforme a Lei nº 9.434/1997. No Rio Grande do Norte, essa função é exercida pelo BDH vinculado ao Departamento de Odontologia da UFRN, cuja análise estrutural das amostras pode revelar aspectos do perfil de saúde bucal da população doadora. Objetivo: Identificar e quantificar anomalias na coroa e raiz de dentes permanentes armazenados no BDH/UFRN. Métodos: Foram avaliados dentes permanentes das arcadas superior e inferior, excluindo-se dentes com coroas metálicas/cerâmicas/plásticas e com fratura radicular. A classificação dos dentes e anomalias foi realizada por inspeção visual e registrada em planilha eletrônica. Resultados: Foram analisados 341 dentes, dos quais 66 (19,4%) apresentaram anomalias. A dilaceração radicular foi a anomalia mais prevalente (22,9% na arcada superior; 15,4% na inferior), principalmente nos molares, grupo que também predominou nas demais alterações. Incisivos e caninos inferiores não apresentaram anomalias. Conclusão: As anomalias concentraram-se nos molares, corroborando a literatura sobre a maior susceptibilidade desse grupo a alterações radiculares, reforçando a importância da triagem anatômica no BDH, contribuindo tanto para a correta destinação do material biológico ao ensino e à pesquisa quanto para a compreensão do perfil odontológico da população do Rio Grando do Norte.

Palavras-chave: Dente, Bancos de Espécimes Biológicos, Anormalidades Dentárias, Cárie

TITLE: Analysis of the occurrence of anomalies in human teeth at the Human Tooth Biobank of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Abstract

Introduction: Teeth used for teaching and research must be obtained from Human Tooth Biobanks (HTB), in accordance with Law No. 9,434/1997. In Rio Grande do Norte, this role is fulfilled by the HTB affiliated with the Department of Dentistry at UFRN, whose anatomical analysis of the samples can reveal aspects of the oral health profile of the donor population. Objective: To identify and quantify crown and root anomalies in permanent teeth stored at the UFRN Human Tooth Biobank. Methods: Permanent teeth from the upper and lower arches were evaluated, excluding teeth with metal, ceramic, or plastic crowns and those with root fractures. Classification of the tooth group and anomalies (taurodontism, microdontia, root dilaceration, and fused roots) was performed by visual inspection and recorded in an electronic spreadsheet. Results: A total of 341 teeth were analyzed, of which 66 (19.4%) presented an anomaly. Root dilaceration was the most prevalent finding (22.9% in the upper arch; 15.4% in the lower arch), concentrated in molars, which also predominated in the other alterations. No anomalies were found in lower incisors and canines. Conclusion: Anomalies were concentrated in molars, corroborating the literature regarding this group's greater susceptibility to root alterations, reinforcing the importance of anatomical screening at the HTB, contributing both to the correct allocation of biological material for teaching and research and to the understanding of the dental profile o

Keywords: Tooth, Biological Specimen Banks, Tooth Abnormalities, Dental Caries

Introdução

No Brasil, a Lei nº 9.434/1997 reconhece o dente como um órgão, razão pela qual os dentes utilizados em atividades de ensino e pesquisa devem, obrigatoriamente, ser provenientes de um Biobanco de Dentes Humanos (BDH). O BDH funciona como um repositório institucional sem fins lucrativos, responsável por coletar, processar e armazenar esses dentes, garantindo o cumprimento das normas éticas, legais e de biossegurança (Martínez-Martínez & Garrocho-Rangel, 2025; Ministério da Saúde, Portaria Nº 2.201, de 14 de setembro de 2011).

No Rio Grande do Norte, essa função é exercida pelo Biobanco de Dentes Humanos vinculado ao Departamento de Odontologia da UFRN (DOD/UFRN), pioneiro no estado e o segundo do Nordeste a obter aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), operando de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Portaria Nº 2.201/2011 do Ministério da Saúde para biorrepositórios e biobancos com finalidade de pesquisa. Ao longo de sua trajetória, o BDH tem recebido doações de dentes humanos que sustentam atividades de ensino em diferentes níveis, servindo como base prática para o treinamento clínico e para investigações científicas na área.

Os dentes humanos extraídos (DHE), sejam permanentes ou decíduos, constituem uma importante fonte de material biológico, sendo amplamente utilizados para fins de pesquisa e ensino. Pesquisadores empregam os DHE para avaliar a interação entre materiais restauradores e tecidos dentários, isolar e analisar moléculas bioativas do tecido pulpar sob diferentes condições experimentais, além de utilizá-los como modelos de simulação de procedimentos ex vivo voltados à prevenção de doenças bucais (Martínez-Martínez & Garrocho-Rangel, 2025; Sandhu et al., 2012; Lee et al., 2007).

As amostras recebidas pelo BDH são registradas principalmente com base na anatomia dentária, critério que orienta sua classificação e armazenamento. A análise criteriosa dessas amostras pode oferecer informações valiosas sobre as condições de saúde bucal da população, permitindo identificar demandas no campo da saúde bucal pública, além de fornecer dados relacionados aos cuidados e às práticas terapêuticas empregadas ao longo do tempo.

Essa análise também pode subsidiar o planejamento de estratégias direcionadas de saúde pública. O diagnóstico correto e específico do padrão de cárie dentária possibilita orientar intervenções mais eficazes, contribuindo para a saúde bucal da população brasileira (Fejerskov, 1997). Da mesma forma, a avaliação das amostras permite compreender a frequência e a distribuição das anomalias dentárias, considerando sua origem genética ou seu caráter secundário (Garib et al., 2010).

OBJETIVO

Analisar amostras de dentes humanos permanentes armazenados no Biobanco de Dentes Humanos da UFRN no intuito de identificar e quantificar anomalias nas estruturas da coroa e raiz dentária.

Metodologia

A amostra foi composta por dentes permanentes provenientes do acervo do Biobanco de Dentes Humanos da UFRN, contemplando os seguintes grupos dentários das arcadas superior e inferior: incisivos centrais e laterais, caninos, primeiros e segundos pré-molares e molares. Não foram considerados elegíveis para o estudo os dentes decíduos, os elementos com restaurações em coroa metálica ou cerâmica, e aqueles que apresentavam fratura radicular.

A identificação de cada elemento dentário quanto ao grupo e à posição na arcada foi feita exclusivamente por inspeção visual. Nessa mesma etapa, cada dente foi examinado quanto à presença de anomalias dentárias como a taurodontia, a microdontia, a dilaceração radicular e a fusão de raízes, sendo registrado o tipo de alteração observada, quando presente.

As informações levantadas foram compiladas em planilha eletrônica (Microsoft Excel), organizadas de modo a permitir a contagem dos dentes acometidos por cada tipo de anomalia e a posterior análise dos resultados.

Resultados e Discussões

A caracterização da amostra de dentes armazenados no Biobanco de Dentes Humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) constitui uma etapa essencial para a investigação da ocorrência de anomalias dentárias, uma vez que reflete, ainda que

indiretamente, aspectos do perfil odontológico da população da qual esses elementos são provenientes. Ao todo, foram analisados 341 dentes, distribuídos entre os diferentes grupos dentários: 23 incisivos superiores, 57 incisivos inferiores, 31 caninos superiores, 35 caninos inferiores, 22 pré-molares superiores, 36 pré-molares inferiores, 77 molares superiores e 60 molares inferiores (Tabela 1). Essa distribuição por grupo dentário serviu de base para a identificação e a quantificação das alterações anatômicas observadas na amostra, permitindo avaliar em quais elementos as anomalias dentárias se manifestaram com maior frequência.

Considerando-se a presença de anomalias dentárias na arcada superior, observou-se dilaceração radicular em 1 incisivo, 3 caninos, 1 pré-molar e 30 molares. As raízes fusionadas foram identificadas exclusivamente no grupo dos molares, totalizando 17 elementos. A hipercementose acometeu 4 pré-molares e 2 molares, enquanto a microdontia e as estruturas dentárias supranumerárias (cúspide e/ou raiz) restringiram-se aos molares, em 4 e 3 elementos, respectivamente. Não houve registro de taurodontia nesse grupo (Tabela 2). Observa-se que, no que se refere à ocorrência de anomalias dentárias na arcada superior, os molares constituíram o grupo dentário mais acometido, concentrando a maioria das alterações identificadas na amostra.

Em relação à arcada inferior, a dilaceração radicular esteve presente em 2 pré-molares e 27 molares, não sendo observada em incisivos e caninos. As raízes fusionadas acometeram 6 molares, enquanto a hipercementose foi identificada em 2 pré-molares. A microdontia foi registrada em 3 molares, e a taurodontia, anomalia menos frequente na amostra, foi observada em apenas 1 molar inferior. Não houve registro de estruturas supranumerárias nesse grupo (Tabela 3). Observa-se que, assim como na arcada superior, os molares inferiores concentraram a maior parte das anomalias dentárias identificadas, enquanto os grupos anteriores (incisivos e caninos) não apresentaram nenhuma alteração registrada na amostra estudada.

Segundo Asheghi et al., 2022, a maior complexidade anatômica dos molares, decorrente do maior número de raízes e de um período mais prolongado de formação radicular, associada a fatores como o remodelamento do osso alveolar durante a erupção dentária, contribuiria para a maior predisposição desse grupo dentário a alterações na trajetória de desenvolvimento radicular. Essa explicação é compatível com o padrão observado na amostra do Biobanco de Dentes Humanos da UFRN, na qual a dilaceração radicular concentrou-se de forma expressiva nos molares e esteve praticamente ausente nos dentes anteriores, cuja formação radicular é anatomicamente mais simples e ocorre em período mais curto.

Conclusão

A análise das 341 amostras do Biobanco de Dentes Humanos da UFRN revelou anomalia dentária em 19,4% dos dentes avaliados, com concentração expressiva nos molares, sobretudo dilaceração radicular, a alteração mais prevalente, enquanto incisivos e caninos inferiores não apresentaram nenhum registro. Esse padrão é consistente com a literatura, que associa a maior complexidade radicular dos molares a uma maior susceptibilidade a alterações de desenvolvimento.

Os achados reforçam a importância da triagem anatômica criteriosa das amostras pelo BDH, tanto para sua correta destinação ao ensino e à pesquisa quanto para a compreensão do perfil odontológico da população do estado do Rio Grande do Norte.

Referências

ASHEGHI, Bahar; SAHEBI, Safoora; ZANGOOEI BOOSHEHRI, Maryam; SHEYBANIFARD, Farnaz. Evaluation of root dilaceration by cone beam computed tomography in Iranian south subpopulation: permanent molars. Journal of Dentistry Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, v. 23, n. 2, supl., p. 369-376, set. 2022. DOI: 10.30476/DENTJODS.2021.91035.1547. Disponível em:https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9789339/. Acesso em: 27 ago. 2026.

BRASIL. Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. Presidência da República; Casa Civil; Subchefia para Assuntos Jurídicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa.

FEJERSKOV O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol, 1997;25(1):5-12.

GARIB DG, Alencar BM, Ferreira FV, Ozawa TO. Anomalias dentárias associadas: o ortodontista decodificando a genética que rege os distúrbios de desenvolvimento dentário. Dental Press J Orthod [Internet], 2010 Mar;15(2):138-57.

LEE J, Nettey-Marbell A, Cook A. Using Extracted Teeth for Research. The Journal of the American Dental Association 2007, 138, 1599-1603 DOI:10.14219/jada.archive.2007.0110 Disponível em: https://jada.ada.org/article/S0002-8177(14)63807-1/abstract Acesso em: 21 ago. 2026

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R. E., & Garrocho-Rangel, J. A.. Use of extracted human teeth in oral research: Ethical and legal considerations. Journal of the American Dental Association 2026; 157(2), 184–191. DOI:10.1016/j.adaj.2025.10.008 Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41329117/ Acesso em: 20 ago. 2026

SANDHU, Simarpreet V. et al. Sterilization of extracted human teeth:: a comparative analysis. Journal Of Oral Biology And Craniofacial Research, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 170-175, set. 2012. DOI: 10.1016/j.jobcr.2012.09.002. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942122/. Acesso em: 20 ago. 2026

Anexos



Tabela 1



Tabela 2



Tabela 3

CÓDIGO: SB1185

AUTOR: ANA PAULA DE BRITO ARAUJO

ORIENTADOR: RENATA GONCALVES FERREIRA

TÍTULO: Quem somos nós? Fotoidentificação de macacos-prego-galego em fragmento de mata atlântica

Resumo

Macacos-prego apresentam padrões de dispersão variáveis entre espécies, com implicações na estrutura genética e social dos grupos. Os indivíduos de macacos-prego-galego (Sapajus flavius) que habitam o Fragmento da Divisa, no município de Caaporã - PB, são acompanhados desde 2008, mas não possuíam identificação individual. Através do método de foto-identificação, registramos e agrupamos indivíduos com base nos padrões únicos de manchas dos rostos e das barbelas dos macacos. Um resultado importante foi a documentação pela primeira vez, por foto-recaptura, da migração de um grupo de 8 animais, incluindo um macho adulto foto-identificado, originalmente identificado no Fragmento da Divisa e posteriormente no Fragmento Piseiro, que estão a uma distância de 260 metros um do outro. Esses dados confirmam o potencial da foto-identificação para revelar processos sociais invisíveis ao monitoramento tradicional.

Palavras-chave: Migração; Fragmentação; Identificação individual.

TITLE: Who are we? Photo-identification of blonde capuchin monkeys in an Atlantic Forest fragment.

Abstract

Capuchin monkeys exhibit variable dispersal patterns across species, with direct implications for group genetic and social structure. The blonde capuchins (Sapajus flavius) inhabiting the Divisa Fragment, between the states of Paraíba and Pernambuco, have been monitored since 2008; however, they lacked individual identification. Using photo-identification, we recorded and categorized individuals based on the unique patterns on their faces and throatsacks. A major finding was the first photo-recaptured documentation of the migration of a group of 8 individuals, including a photo-identified adult male, originally recorded in the Divisa Fragment and subsequently in the Piseiro Fragment, which are 260 meters of open farmland appart. These data highlight the potential of photo-identification to uncover social processes undetectable through traditional monitoring.

Keywords: Migration; Fragmentation; Individual identification.

Introdução

Os macacos-prego do gênero Sapajus são modelos para estudos em psicobiologia e antropologia biológica devido à sua elevada razão neocortical e à apresentação de comportamentos complexos em contextos de alimentação, como o uso de pedras para quebrar sementes, e contextos sociais, como coalizões (Fragaszy et al., 2004). O padrão de filopatria e dispersão em Sapajus não é uniforme entre as espécies: em S. libidinosus as fêmeas são filopátricas e estabelecem hierarquias de dominância lineares, coalizões e vínculos de grooming com fêmeas aparentadas, enquanto os machos dispersam ao atingir a maturidade sexual (Tokuda et al., 2012; Verderane et al., 2013). Já em S. nigritus as fêmeas competem menos entre si e também podem transferir entre grupos, de modo que nenhum dos sexos é consistentemente filopátrico (Tokuda et al., 2012). Essa variação intragênero tem implicações diretas na estrutura genética e social dos grupos, influenciando desde a formação de coalizões entre machos não aparentados até o fluxo gênico entre populações fragmentadas (Kappeler e Van Schaik, 2002; Bissonnette et al., 2014; Huang et al., 2017). Para Sapajus flavius, o padrão de filopatria e dispersão permanece pouco conhecido e a documentação de eventos de migração em populações selvagens ainda é escassa, sobretudo em espécies ameaçadas que vivem em fragmentos florestais isolados, onde o monitoramento contínuo é logisticamente desafiador. Todas as espécies de macaco-prego enfrentam declínio populacional (IUCN, 2024). O macaco-prego-galego (Sapajus flavius), ameaçado de extinção, habita regiões de Caatinga e Mata Atlântica no Nordeste brasileiro (Ferreira et al., 2009) e sofre com a fragmentação de habitat, caça e comércio ilegal, limitando sua população a pequenos fragmentos florestais (IUCN, 2024). Desde 2008, o Laboratório de Estudos em Coexistência da UFRN acompanha uma população de macacos-prego-galegos que habita um fragmento de 270 ha entre a Paraíba e Pernambuco. Os estudos realizados, porém, não contaram com a identificação individual dos animais, o que dificulta conferir estruturas sociais delineadas na população. A estimativa populacional é feita por contagens em varreduras, distinguindo apenas entre diferentes classes sexo-etárias, sem diferenciação entre indivíduos. Em 2024 houve mudança no uso da terra na matriz do fragmento, com a remoção da cana-de-açúcar ao redor da mata, alimento reserva consumido em períodos de baixa produtividade de frutos (Lins e Ferreira, 2019). Nessa conjuntura, dois grandes grupos fazem uso de diferentes áreas no fragmento (Paraíba e Pernambuco), mas não é possível afirmar se houve perda de indivíduos ou divisão da população, devido à falta de diferenciação entre os animais (Creegan et al., em revisão). Parte dessa variação pode refletir a dinâmica natural de dispersão dos indivíduos que até então nunca foi registrada diretamente nesta população. Métodos de captura e marcação, embora úteis, são caros e podem comprometer a saúde do animal (Fernandez-Duque et al., 2018), algo preocupante para espécies ameaçadas (Hoxeng et al., 2007; Wasserman et al., 2013). Técnicas não invasivas, como a foto-identificação, contornam esses desafios ao aproveitar características morfológicas únicas dos indivíduos, permitindo identificação e monitoramento menos arriscados, já utilizadas em cetáceos (Gomez-Salazar et al., 2011), roedores (Burn et al., 2021) e primatas (Crouse et al., 2015; Guo et al., 2020; Schofield et al., 2019). Este trabalho teve como objetivo geral realizar a foto-identificação de indivíduos de macacos-prego-galego (Sapajus flavius) com base em manchas visíveis na barbela e no rosto dos indivíduos. Como objetivos específicos buscamos: I. estimar o tamanho populacional; II. Verificar se os mesmos indivíduos estão usando áreas diferentes ou se grupos diferentes usam áreas diferentes. Em particular, buscamos verificar se o tamanho populacional de 60 indivíduos oferecido pelo método de varredura é confirmado.

Metodologia

A área de estudo é o Fragmento da Divisa (07º31'34.2"S 034º57'47.7"O), um fragmento de Mata Atlântica secundária com aproximadamente 270 ha, localizado na fronteira entre os estados da Paraíba e Pernambuco. A área monitorada pela equipe de pesquisa está situada no lado paraibano do fragmento, onde o Laboratório de Estudos em Coexistência da UFRN (Co-Lab) mantém o acompanhamento contínuo da população desde 2008. A metodologia de scan sugere que o grupo de macacos-prego-galegos (Sapajus flavius) acompanhado possui aproximadamente 60 indivíduos, contendo todas as classes sexo-etárias (com 45% machos adultos, 23% fêmeas e 32% juvenis) (Peruzzo, 2023), conforme classificações definidas por Izawa (1980). Essa composição heterogênea foi considerada na coleta de dados, de modo a garantir a representatividade de todas as classes no acervo fotográfico. Os registros fotográficos foram realizados em dias de campo entre outubro de 2025 e junho de 2026, utilizando uma câmera Nikon Coolpix P950 e uma câmera filmadora Sony Handycam HDR-CX675 Full HD, ambas já disponíveis no laboratório. O esforço amostral teve como objetivo maximizar o número de fotografias obtidas em cada dia de campo, distribuídas ao longo de diversos dias e sem direcionamento a qualquer classe etária ou sexual específica. Ao todo, houve 4 dias de coleta em cada um dos 8 meses, com campos entre 8h e 16h, totalizando em torno de 280 horas de esforço amostral. Cada indivíduo foi fotografado múltiplas vezes, em diferentes momentos e ângulos, a fim de aumentar a variabilidade de imagens disponíveis para a posterior identificação facial. Além do acervo coletado durante o período de execução do projeto, também foram incorporadas fotografias de indivíduos registradas desde dezembro de 2019 por outros integrantes da equipe de campo, ampliando a janela temporal disponível para comparação entre indivíduos. Análise de dados As fotografias de um mesmo indivíduo foram agrupadas manualmente em pastas e associadas a códigos de identificação (por exemplo, "MA01" para o primeiro macho adulto identificado). O agrupamento foi realizado com base em características morfológicas individuais estáveis, como as regiões do rosto, da barbela, do pênis e os padrões de pelagem do corpo. Para fins de rigor metodológico, assumiu-se que, em adultos, essas marcas naturais são permanentes e não se alteraram ao longo do período do estudo, de modo que cada padrão analisado corresponde a um único indivíduo. Cada correspondência entre fotografias de um mesmo indivíduo foi conferida por mais de um membro da equipe antes da confirmação do código de identificação, reduzindo a chance de erros de classificação decorrentes de variações de ângulo, iluminação ou estágio de muda da pelagem. Registros fotográficos de qualidade insuficiente para permitir comparação segura, por desfoque, obstrução parcial do corpo ou distância excessiva, foram descartados do banco de dados de identificação, ainda que utilizados para fins de contagem geral do grupo.

Resultados e Discussões

O projeto previu o uso de uma ferramenta de inteligência artificial, o software WildID para auxílio na foto-identificação e estimativa populacional. Entretanto, a quantidade e a qualidade da maioria das fotografias, condicionadas por fatores como a movimentação constante dos animais no dossel e a luminosidade variável do ambiente florestal, foram

insuficientes para o treinamento adequado do software WildID. Diante dessa limitação, a categorização das fotografias foi conduzida de forma inteiramente manual, exigindo comparação visual sistemática entre os registros. Como consequência direta dessa limitação, os métodos de estimativa populacional baseados no modelo de Lincoln-Petersen, implementados através do programa MARK, também não puderam ser aplicados, já que dependiam das estimativas de correspondência geradas pelo WildID. Diante desse cenário, o tamanho populacional foi estimado pelo número mínimo de animais identificados, sem poder probabilístico para gerar valores médios estimados. No total, 7.141 registros fotográficos foram triados para a finalidade de identificação dos animais individualmente. Pela ausência de manchas em infantes e juvenis, as identificações puderam ser feitas apenas entre os adultos (fêmeas e machos). Foram identificados individualmente pelo menos 31 fêmeas adultas, 27 machos adultos e 4 machos subadultos, alguns indivíduos tendo registros de avistamento desde 2019. Esses valores podem indicar que a metodologia de scan utilizada para contagem dos grupos pelo laboratório pode estar subestimando os números nos grupos, visto que, no máximo, se contavam 60 indivíduos por scan, contando com juvenis, entretanto, sabe-se que há pelo menos essa mesma quantidade de indivíduos adultos. No período analisado, foi registrada uma recaptura, correspondente ao avistamento de um macho adulto (MA04), fotografado pela última vez no Fragmento da Divisa na data de 12/07/2025, e o mesmo foi reavistado posteriormente no Fragmento Piseiro (07º53'41.1"S 034º94'99.3"O), que fica a uma distância mínima de 260 metros sem conexão florestal. Neste novo fragmento se encontravam outros 7 indivíduos, outros 3 machos adultos, e 4 fêmeas adultas, totalizando 8 indivíduos. Não se sabe ao certo se os outros macacos também vieram da Mata da Divisa nesse período, pois, apesar de haver alguns indivíduos com marcação semelhante no banco de dados, não foi possível assegurar, com as comparações das fotos que temos, se eram os mesmos. Se de fato apenas o macho migrou, isso pode sugerir que em Sapajus flavius as fêmeas sejam filopátricas, enquanto os machos migram para outros grupos. Se o grupo tiver migrado como um todo, isso pode ser uma consequência da mudança da matriz ao redor do fragmento florestal. A cana-de-açúcar servia de alimento reserva para a população, pois sua produção era abundante e estava disponível praticamente o ano todo (Lins e Ferreira, 2019). A Mata da Divisa agora é cercada por terrenos abandonados, roça branca, como inhame, mandioca e milho, e por fábricas. Antes dessa mudança, o grupo era estimado em 133 indivíduos (Lins e Ferreira, 2019), mas estudos posteriores estimaram a população cada vez menor, chegando a 60 indivíduos depois da mudança (Peruzzo, 2023). O grupo original perdeu sua fonte estável de alimento reserva, pois, apesar de pegar cultivos dessas novas plantações, elas não produzem a mesma quantidade ao longo do ano todo que a cana-de-açúcar. Essa mudança de pressão ecológica gerada pela alteração da matriz pode ter levado os animais a realizarem comportamentos de maior risco e a explorarem novos ambientes, a fim de buscar mais recursos. Estudos como este são importantes para iniciar a realização de estudos longitudinais. A partir desse acompanhamento individualizado, registramos pela primeira vez um evento de migração de um macho foto-identificado, demonstrando o potencial do método adotado como ferramenta para capturar futuros processos migratórios, de indivíduos ou grupos, até então invisíveis ao monitoramento tradicional por varredura, abrindo caminho para perguntas mais refinadas sobre a dinâmica social do grupo.

Conclusão

Foi evidenciado que machos adultos do grupo acompanhado podem migrar para fragmentos vizinhos e a foto-identificação torna-se um método facilitador para compreensão da localização dos macacos-prego e possíveis migrações ao decorrer dos anos de acompanhamento. Os registros fotográficos também permitirão atentar à temporalidade dos eventos, com base nas datas dos registros realizados. Sendo construído um banco de dados de registros dos animais presentes no Fragmento Piseiro, podemos conferir se são indivíduos que já estavam no fragmento quando houve a migração, ou se são indivíduos oriundos do mesmo grupo do MA01. A escolha da fotoidentificação como método se justifica pelo caráter não invasivo da técnica, minimizando riscos à saúde de indivíduos de uma espécie ameaçada de extinção, evitando os custos e os riscos associados a métodos de captura física e marcação. O banco de dados de indivíduos identificados construído ao longo do projeto estabelece a base para a continuidade do monitoramento individualizado da população, permitindo que estudos futuros retomem a estimativa populacional à medida que o acervo fotográfico for ampliado e qualificado.

Referências

Bissonnette, A., Franz, M., Schülke, O., & Ostner, J. (2014). Socioecology, but not cognition, predicts male coalitions across primates. Behavioral Ecology, 25(4), 794–801. Burn, C. C., Mazlan, N. H., Chancellor, N., & Wells, D. J. (2021). The pen is milder than the blade: identification marking mice using ink on the tail appears more humane than ear-punching even with local anaesthetic. Animals, 11(6), 1664. Creeggan, J. (2024). Spatial Cohesion of Blond Capuchins (Sapajus flavius) in an Atlantic Forest Fragment. [Tese de Mestrado]. Concordia University Montréal, Québec, Canada. Crouse, D., Richardson, Z., Jain, A., Tecot, S., Baden, A., & Jacobs, R. (2015). Lemur face recognition: tracking a threatened species and individuals with minimal impact. MSU Technical Report 2015. MSU-CSE-15-8. Fernandez-Duque, M., Chapman, C. A., Glander, K. E., & Fernandez-Duque, E. (2018). Darting primates: steps toward procedural and reporting standards. International Journal of Primatology, 39, 1009-1016. Ferreira, R. G., Jerusalinsky, L., Silva, T. C. F., de Souza Fialho, M., de Araújo Roque, A., Fernandes, A., & Arruda, F. (2009). On the occurrence of Cebus flavius (Schreber 1774) in the Caatinga, and the use of semi-arid environments by Cebus species in the Brazilian state of Rio Grande do Norte. Primates, 50, 357-362. Fragaszy, D. M., Visalberghi, E., & Fedigan, L. M. (2004). The complete capuchin: the biology of the genus Cebus. Cambridge University Press. Gomez-Salazar, C., Trujillo, F., & Whitehead, H. (2011). Photo-Identification: A reliable and noninvasive tool for studying pink river dolphins (Inia geoffrensis). Aquatic Mammals, 37(4), 472-485. Guo, S., Xu, P., Miao, Q., Shao, G., Chapman, C. A., Chen, X., He, G., Fang, D., Zhang, H., Sun, Y., Shi, Z., & Li, B. (2020). Automatic identification of individual primates with deep learning techniques. iScience, 23(8), 101412. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101412 Hoxeng, C. M., Apling, M. M., Ritson, P. I., & Portfors, C. V. (2007). Light tagging disrupts social dynamics of bat harems. Acta Chiropterologica, 9(1), 161–169. doi:10.3161/1733-5329(2007)9[161:ltdsdo]2.0.co;2 Huang, C., Bian, X., Liu, K., Pan, D., Qi, X., & Li, B. (2017). Male dispersal pattern in golden snub-nosed monkey (Rhinopithecus roxellana) in Qinling Mountains and its conservation implication. Scientific Reports, 7, 46217. IUCN, International Union for Conservation of Nature. (2024). The IUCN Red List of Threatened. https://www.iucnredlist.org/search?query=sapajus&searchType=species Izawa, K.

1980. “Social Behavior of the Wild Black-Capped Capuchin (Cebus apella).” Primates 21: 443–467. Kappeler, P. M., & van Schaik, C. P. (2002). Evolution of primate social systems. International Journal of Primatology, 23(4), 707–740 Lins, P. G. A. D. S., & Ferreira, R. G. (2019). Competition during sugarcane crop raiding by blond capuchin monkeys (Sapajus flavius). Primates, 60, 81-91. Peruzzo, S. (2023). O ir e vir da gente, coesão de grupo de macacos-prego-galegos (Sapajus flavius). [Tese de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. Schofield, D., Nagrani, A., Zisserman, A., Hayashi, M., Matsuzawa, T., Biro, D., & Carvalho, S. (2019). Chimpanzee face recognition from videos in the wild using deep learning. Science advances, 5(9), eaaw0736. Tokuda, M., Martins, M.M., Izar, P. (2012). Flexible and conservative features of social systems in tufted capuchin monkeys: Comparing the socioecology of Sapajus libidinosus and Sapajus nigritus. American Journal of Primatology, 74(6), 552–563. Verderane, M.P., Izar, P., Visalberghi, E., Fragaszy, D. M. (2013). Socioecology of wild bearded capuchin monkeys (Sapajus libidinosus): An analysis of social relationships among female primates that use tools in feeding context. Behaviour, 150(6), 659–689. Wasserman, M. D., Chapman, C. A., Milton, K., Goldberg, T. L., & Ziegler, T. E. (2013). Physiological and Behavioral Effects of Capture Darting on Red Colobus Monkeys (Procolobus rufomitratus) with a Comparison to Chimpanzee (Pan troglodytes) Predation. International Journal of Primatology, 34(5), 1020–1031. doi:10.1007/s10764-013-9711-y White, G.C. (2008). Closed population estimation models and their extensions in Program MARK. Environ Ecol Stat 15, 89–99. https://doi.org/10.1007/s10651-007-0030-3

CÓDIGO: SB1188

AUTOR: MARIA HELENA BRANDAO DA SILVA

ORIENTADOR: HUGO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ROCHA

TÍTULO: Blends Funcionais com Ação Antioxidante: Aplicação de Polissacarídeos Sulfatados e Extratos Vegetais

Resumo

Os radicais livres são moléculas instáveis e altamente reativas produzidas pelo metabolismo normal do corpo, tanto em resposta a fatores externos quanto ao próprio metabolismo. Quando essas moléculas se acumulam e ultrapassam a capacidade do sistema antioxidante, ocorre o estresse oxidativo. Nesse contexto, as moléculas antioxidantes desempenham um papel crucial na manutenção da saúde e na prevenção de danos celulares. Especiarias e frutas, como alho e limão, são fontes naturais de antioxidantes que têm sido amplamente exploradas. Neste trabalho, damos continuidade à avaliação da atividade antioxidante de blends contendo extrato aquoso de alho e limão em três diferentes proporções, bem como dos isolados. Nesse sentido foi realizada nova extração aquosa de limão e alho, formulação de blends, novos ensaios de quelação de íons ferro e cobre, comparação e revisão em relação aos resultados anteriores.

Palavras-chave: estresse oxidativo, alginato, extrato vegetal, polissacarídeos ácidos.

TITLE: Production, characterization, and evaluation of the antioxidant activity of blends containing alginate and aqueous extracts of lemon and garlic

Abstract

Free radicals are unstable, highly reactive molecules produced by the body's normal metabolism, arising both from external factors and metabolic processes themselves. Oxidative stress occurs when these molecules accumulate and overwhelm the antioxidant system's capacity. In this context, antioxidant molecules play a crucial role in maintaining health and preventing cellular damage. Spices and fruits—such as garlic and lemon—are natural sources of antioxidants that have been widely investigated. In this study, we continue evaluating the antioxidant activity of blends containing aqueous extracts of garlic and lemon in three different ratios, as well as the individual extracts. To this end, we performed new aqueous extractions of lemon and garlic, formulated blends, conducted new iron and copper ion chelation assays, and compared and reviewed the findings against previous results.

Keywords: oxidative stress, alginate, plant extract, acidic polysaccharides.

Introdução

Os radicais livres são altamente tóxicos, o acúmulo desses metabólitos pode destruir todas as macromoléculas das células, como proteínas, lipídios e moléculas de DNA mitocondrial e nuclear, o que produz um estresse oxidativo grave (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018). O estresse oxidativo pode ser indicado como a causa raiz de várias doenças humanas, dentre elas a aterosclerose (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018). A aterosclerose é uma obstrução nas paredes das artérias que nutrem o coração, essa complicação é a causa de diversas doenças cardiovasculares, como infarto, morte súbita e acidentes vasculares cerebrais. As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade e morbidade mundial, resultando em 17 milhões de mortes a cada ano, estima-se que esse número chegará a 24,8 milhões em todo o mundo até 2030 (Estruch et al., 2013). Todavia, apesar da gravidade dessa condição na população mundial, o uso dos medicamentos utilizados para aliviarem os sintomas das doenças e reduzirem a taxa de mortalidade, ainda apresentam desvantagens (XU e SONG, 2021), pois o uso contínuo dos fármacos disponíveis comercialmente, podem causar danos hepáticos, renais e em outros órgãos (XU e SONG, 2021). Nesse contexto, há necessidade de encontrar fármacos e tratamentos mais eficazes e seguros que melhorem o tratamento sem aumentar os riscos à saúde do paciente, uma fonte bastante explorada quanto às propriedades terapêuticas são as ervas, especiarias e frutas, como alho e limão (NASEEM et al., 2020). Na literatura é possível encontrar trabalhos conduzidos com alho e limão com relato de efeitos hipolipemiantes quando administrados conjuntamente ou combinados com outros compostos bioativos (ALIASGHARPOUR, 2014; ASLANI et al., 2016; NASEEM, SHAMIM, e KHAN, 2016; ABOLHASSANI et al., 2017; AJAMZIBAD et al., 2021). O alginato é um composto bioativo natural de algas marrons, essa molécula é um polissacarídeo composto por unidades repetidas dos açúcares ácido gulurônico e ácido manurônico(CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009). Os blends são misturas de dois ou mais componentes que possuem propriedades ou aplicabilidades superiores(RAIDY et al., 2014), eles seguem os seguintes critérios: produtos que já tenham sua utilização liberada legalmente por órgãos de vigilância de saúde, baixa ou baixíssima toxicidade, pouco agressores ao meio ambiente, baixo custo e aceitabilidade pelos consumidores(HUSSAIN et al., 2017). Muitos polissacarídeos são utilizados na produção de blends, como xantanas, alginatos e quitosanas(TABASUM et al., 2018). Há também extratos de plantas na composição de blends (SOUZA et al., 2020, FERREIRA et al., 2020), porém a produção de blends com extrato aquoso de limão e alho ainda não foi elucidada. O trabalho tem o objetivo geral de tratamento de doenças cardiovasculares e estresse oxidativo, já que este último também está relacionado com o surgimento de várias disfunções vasculares, considerando o potencial da formulação, produção e uso voltado para atividade antioxidante de blends contendo alginato, e extratos aquosos de limão e alho, como uma alternativa econômica e sustentável de suprir a demanda por fármacos menos danosos no comércio.

Metodologia

1- Alginato: obtido comercialmente. 2- Extrato aquoso de limão e alho: 30 dentes de alho(154,42 g) Allium sativum foram descascados e triturados junto com 1 litro de água

destilada e 4 limões Citrus limon(489 g) cortados em quatro pedaços e sem sementes no liquidificador. Esse conteúdo foi aquecido por 20 minutos no fogão de bancada, resfriado a temperatura ambiente e centrifugado a 8.000 rpm, 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e mantido sob resfriamento no congelador para ser liofilizado, seguindo o método descrito por Abolhassani et al. (2017) com modificações. 3- Blends: Formulados por planejamento de misturas, foram avaliados os blends Bl2(75% de extrato e 25% de alginato), Bl3(25% de extrato e 75% de alginato) e Bl5 (50% de extrato e 50% de alginato, como ponto central). Primeiro, 100 mg do alginato de sódio comercial foi solubilizado em 10 mL de água destilada sob agitação em vórtex e aquecimento controlado. Na sequência, o extrato liofilizado foi pesado, solubilizado em água destilada na concentração de 10 mg/mL e mantido sob refrigeração. Por fim os blends foram preparados mediante a combinação das soluções estoque do alginato e do extrato com volume final de 10 mL. 4- Avaliação da atividade antioxidante: Quelação de ferro determinada usando o método descrito por Carter (1971), que utiliza o reagente ferrozina para formar um complexo com íons de ferro, medido a 562 nm. Quelação de cobre determinada utilizando o método de Megías et al., (2009). As amostras serão adicionadas em microplaca juntamente com violeta de pirocatecol e sulfato de cobre II pentahidratado, sendo a mistura homogeneizada. A absorbância será medida a 632 nm.

Resultados e Discussões

A obtenção do extrato bruto (rendimento de 800 mL a partir de 489 g de limão e 154,42 g de alho) viabilizou a formulação dos blends em proporções delineadas por planejamento de misturas. Primeiro o alho foi descascado e o limão cortado em quatro pedaços, ambos foram triturados no liquidificador em 1L de água destilada, em seguida o conteúdo foi fervido em fogão de bancada por 20 minutos. Após resfriado, o conteúdo foi filtrado e o líquido recolhido (1,2 L) levado à centrífuga. A centrifugação ocorreu a 8.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado (700 mL) e armazenado sob refrigeração. Esse conteúdo foi liofilizado, pesado e solubilizado em água destilada para ser guardado na concentração 10 mg/mL a -18°C. A extração foi satisfatória com rendimento de 67% de extrato bruto, semelhante a outra extração realizada, Esse método atende aos critérios da química verde, pois evita a geração de resíduos nocivos ao meio ambiente, além de ser um pré-requisito fundamental na formulação de blends contendo alginato, uma vez que a utilização de solventes alcoólicos extrairia elevada fração de compostos lipofílicos e apolares, que após a liofilização, ao tentar ressuscitar esse pó seco em meio aquoso com alginato, esses componentes apolares precipitariam ou formariam agregados insolúveis, gerando uma mistura heterogênea e turva. Nesse sentido, para incorporar um extrato alcoólico liofilizado na solução aquosa de alginato, seria obrigatório adicionar surfactantes (como Tween-80 ou DMSO), esses agentes alteram a permeabilidade da membrana celular e introduzem variáveis confusas nos testes de toxicidade e nas medições espectrofotométricas de quelação. A extração aquosa realiza uma seleção fisiológica favorável porque extrai metabólitos ativos capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio e não frações apolares agressivas. Isso explica por que nenhuma formulação foi tóxica para os fibroblastos nas concentrações testadas (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL e 1,5 mg/mL) no ensaio de MTT. Em relação aos compostos bioativos do extrato aquoso de limão e alho, o processo de trituramento prévio rompe os tecidos celulares e ativa a enzima aliinase, convertendo aliína em alicina. Em meio aquoso, a alicina converte-se em organossulfurados hidrossolúveis estáveis. Em relação ao limão,a água solubiliza

eficientemente os ácidos orgânicos (cítrico e ascórbico) e os flavonoides glicosilados polares (hesperidina e eriocitrina). Esses compostos são responsáveis pela atividade antioxidante, atuando no sequestro de radicais livres, modulação enzimática e quelação de íons metálicos de transição, como o cobre e o ferro. Nos ensaios antioxidantes in vitro em relação à atividade quelante, o alginato isolado apresentou atividade de quelação de cobre próxima a 0%. Esse resultado atípico sugere limitações operacionais, como a saturação por íons residuais, a protonação de grupos carboxílicos ou a competição pelo indicador, além da possível influência de fatores físico-químicos como o pH do meio, evidenciando a necessidade de otimização metodológica. Por outro lado, a incorporação do extrato conferiu expressivo ganho funcional: na replicata biológica, todos os blends nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL apresentaram capacidade quelante superior a 70%, equiparando-se ao extrato puro (72,2%). Na concentração de 0,25 mg/mL, os blends Bl2 e Bl5 mantiveram atividade entre 60% e 69%, enquanto o Bl3 e o extrato permaneceram acima de 70% (com pico da atividade quelante do extrato variando de 72% no primeiro ensaio a 79% no segundo). De modo geral, as amostras exibiram um perfil de atividade homogêneo, sem relação dose-dependente. No ensaio de quelação do íon ferro, observou-se um comportamento distinto: apenas o alginato isolado apresentou atividade quelante expressiva e com perfil dosedependente, atingindo cerca de 20% nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL e superando 30% a 1,0 mg/mL. O extrato puro não exibiu capacidade quelante, padrão já verificado em estudos anteriores do grupo. Os blends Bl2 e Bl3 mantiveram valores inferiores a 5% em todas as concentrações, enquanto o Bl5 registrou cerca de 5% na concentração de 0,5 mg/mL e atingiu 10% a 1,0 mg/mL. Esse perfil manteve-se reprodutível em ambas as replicatas biológicas. Embora a atividade do alginato isolado seja inferior à relatada na literatura, o que reitera a necessidade de otimização metodológica, a maior eficácia do Bl5 (50% de alginato) em relação ao Bl2 (75% de alginato) corrobora sua seleção como a formulação mais promissora para testes in vivo. Esse resultado pode ser atribuído à menor viscosidade, à redução do impedimento estérico (menor autoagregação) e à sinergia estrutural do Bl5, fatores que favorecem o acesso dos íons aos sítios ativos em comparação ao Bl2, que possivelmente sofre limitações difusionais pelo seu maior teor do polímero. A escolha do Bl5 é respaldada por estudos prévios desse trabalho. Na Capacidade Antioxidante Total (CAT), o Bl5 (10 mg/mL; 50% alginato / 50% extrato) superou as demais amostras na dosagem de 1000 µg, atingindo 38,9 mg de equivalente de ácido ascórbico por grama, frente a 19,1 mg/g do extrato puro e 1,7 mg/g do alginato. No poder redutor, a maior eficiência foi registrada para o extrato puro (47,4% a 1 mg/mL) e para o Bl1 (40,5%), seguidos pelo Bl5 (26,9%). A avaliação seletiva frente a espécies reativas de oxigênio (EROs) demonstrou que a neutralização do peróxido de hidrogênio atingiu resposta máxima (~100%) em todas as concentrações e formulações. Frente ao radical hidroxila, os blends Bl3 e Bl5 alcançaram capacidade de varredura superior a 100% já na concentração de 0,5 mg/mL (igualando-se ao extrato puro). A avaliação da biocompatibilidade celular em fibroblastos L929 (ensaio MTT) evidenciou a superioridade do Bl5: enquanto o alginato e o extrato isolados causaram queda na viabilidade celular a 0,5 mg/mL (50% e 70%, respectivamente), o Bl5 atenuou essa citotoxicidade, mantendo a viabilidade acima de 80% em todas as faixas testadas, com pico de 100% em 0,5 mg/mL e ausência de toxicidade em 1,0 mg/mL. O conjunto desses dados indica que a matriz de alginato no Bl5 atua de forma protetora, estabilizando os compostos bioativos do extrato e expandindo a margem de segurança celular sem comprometer a neutralização de EROs críticas. Além disso, a substituição de 50% da fração vegetal pelo biopolímero agrega valor econômico e sustentabilidade à formulação.

Conclusão

Considerando a necessidade de fármacos que atuem na prevenção do desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo, a busca por produtos de origem natural e o potencial da formulação de blends contendo alginato e extrato aquoso de limão e alho, o trabalho vem elucidando uma lacuna na literatura no que diz respeito à avaliação da atividade antioxidante dessas formulações frente ao combate de espécies reativas, seja atuando no sequestro de radicais livres ou quelação de íons metálicos, como foi avaliado nos ensaios antioxidantes in vitro. A atividade antioxidante das três formulações foi comprovada tanto em ambiente extremo, avaliada pela Capacidade Antioxidante Total, quanto em condições semelhantes às fisiológicas, como demonstrado pelo Poder Redutor e pela quelação do íon cobre. Dentre elas, destacou-se a formulação Bl5, que obteve resposta máxima na neutralização do peróxido de hidrogênio e no sequestro do radical hidroxila, além de ter sido a única a apresentar capacidade de quelação do íon ferro. Em razão desse desempenho promissor, a formulação Bl5 foi submetida à avaliação de citotoxicidade pelo método do MTT em células 3T3 e L929, ambas fibroblastos, sendo a primeira embrionária e a segunda de tecido adulto já diferenciado, não apresentando efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas. Em síntese, a incorporação do extrato aquoso de limão e alho na matriz polimérica do alginato (Bl5) preservou a funcionalidade dos seus fitoquímicos bioativos, mantendo níveis de atividade antioxidante equivalentes aos do extrato bruto e, em ensaios específicos, superando o seu desempenho mesmo com o emprego de metade da concentração equivalente. Essa potencialização funcional decorre do efeito protetor da rede de alginato, que atua estabilizando os compostos vulneráveis do extrato, como a alicina e os flavonoides glicosilados, contra a degradação oxidativa precoce. Além disso, a presença simultânea das hidroxilas do biopolímero e dos núcleos catecóis e sulfurados do extrato gera um sinergismo estrutural: a matriz não apenas dispersa os fitocompostos de forma homogênea no meio aquoso, maximizando a sua área de contato com as espécies reativas, mas também soma a capacidade nativa do alginato de quelar. Consequentemente, o blend Bl5 atinge a saturação de resposta antioxidante com uma carga fitoquímica substancialmente menor, otimizando a eficiência de dose do biomaterial.

Referências

AJAMZIBAD, H. et al. Effects of boiled garlic and Shirazi lemon on blood lipids in hyperlipidemic patients: a quasi-experimental study. Journal of Herbal Medicine, [S. l.], v. 28, p. 100439, ago. 2021. ABOLHASSANI, M. et al. Investigating the Effects of Anti-hyper Lipidemic Mixture of Garlic, Sour Lemon and Ginger on Lipid Agents of Ratus Norvegicus Alluvia. International Journal of Health Studies, [S. l.], v. 3, n. 3, 7 nov. 2017. ALIASGHARPOUR, M. Lowering effects of lemon and fresh garlic liquid mixture on serum lipids level in hypercholesterolemic women. International Journal of Medical Investigation, [S. l.], v. 3, n. 2, 2014. AL-QADI, S. et al. The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.], v. 141, p. 223–232, 2016. ASLANI, N. et al. Effect of garlic and lemon juice mixture on lipid

profile and some cardiovascular risk factors in people 30-60 years old with moderate hyperlipidaemia: a randomized clinical trial. International Journal of Preventive Medicine, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 95, 2016. AYU, R. et al. Effect of Modified Tapioca Starch on Mechanical, Thermal, and Morphological Properties of PBS Blends for Food Packaging. Polymers, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1187, out. 2018. BARROS-GOMES, J. A. C. et al. In Vivo Evaluation of the Antioxidant Activity and Protective Action of the Seaweed Gracilaria birdiae. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, [S. l.], v. 2018, p. 1-12, ago. 2018. BHARDWAJ, R. L.; PANDEY, S. Juice Blends—A Way of Utilization of Under-Utilized Fruits, Vegetables, and Spices: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, [S. l.], v. 51, n. 6, p. 563-570, jul. 2011. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, [S. l.], v. 254, p. 248-254, 1976. BRANCO, I. G. et al. Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um blend de laranja e cenoura. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 1, p. 7-12, 2007. CAMARA, R. B. G. et al. Heterofucans from the brown seaweed Canistrocarpus cervicornis with anticoagulant and antioxidant activities. Marine Drugs, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 124–138, 2011. COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomedicine and Pharmacotherapy, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 21–28, 2010. DHANAVADE, M. J. et al. Study Antimicrobial Activity of Lemon (Citrus lemon L.) Peel Extract. British Journal of Pharmacology and Toxicology, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 119-122, 2011. DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. Analytical Biochemistry, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 645–647, 1976. DOGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfate polysaccharides. Biochemical Journal, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 106, 1962. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. Analytical Chemistry, [S. l.], v. 28, p. 350-356, 1956. FAGGIO, C. et al. Potential use of polysaccharides from the brown alga Undaria pinnatifida as anticoagulants. Brazilian Archives of Biology and Technology, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 798–804, 2015. FERNANDES-NEGREIROS, M. M. et al. Gallic acid-laminarin conjugate is a better antioxidant than sulfated or carboxylated laminarin. Antioxidants, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–24, 2020. FERREIRA, A. O. et al. Postulated Adjuvant Therapeutic Strategies for COVID-19. Journal of Personalized Medicine, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 80, ago. 2020. FLORA, G. D.; NAYAK, M. K. A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. Current Pharmaceutical Design, [S. l.], v. 25, n. 38, p. 4063-4084, dez. 2019. FIDELIS, G. P. et al. Proteolysis, NaOH and Ultrasound-Enhanced Extraction of Anticoagulant and Antioxidant Sulfated Polysaccharides from the Edible Seaweed, Gracilaria birdiae. Molecules, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 18511-18526, 13 nov. 2014. FORMAN HJ, ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. Nat Rev Drug Discov. 2021 Sep;20(9):689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1. Epub 2021 Jun 30. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 2021 Aug;20(8):652. doi: 10.1038/s41573-021-00267-5. GIBIS, MONIKA. Effect of Oil Marinades with Garlic, Onion, and Lemon Juice on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Beef Patties. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 55, n. 25, p. 10240-10247, 2007. GUPTA, R.; MOHAN, I.; NARULA, J. Trends in Coronary Heart Disease Epidemiology in India. Annals Of Global Health, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 307, 29 jun. 2016. HAN, Y. et al. Separation, characterization and anticancer activities of a sulfated polysaccharide from Undaria pinnatifida. International Journal of Biological Macromolecules, [S. l.], v. 83, p. 42–49, 2016. HASHEMI, M. M.; AMINLARI, M.; MOOSAVINASAB, M. Preparation of and studies on the functional

properties and bactericidal activity of the lysozyme–xanthan gum conjugate. LWT - Food Science and Technology, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 594-602, jul. 2014. HUSSAIN, A. et al. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: a review. International Journal of Biological Macromolecules, [S. l.], v. 94, p. 10-27, jan. 2017. KIM, E. A. et al. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model. Carbohydrate Polymers, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 185–191, 2014. KOZLOV AV, JAVADOV S, SOMMER N. Cellular ROS and Antioxidants: Physiological and Pathological Role. Antioxidants (Basel). 2024 May 14;13(5):602. doi: 10.3390/antiox13050602. LARIMI, S. G.; DARZI, H. H.; DARZI, G. N. Fabrication and characterization of polyaniline/xanthan gum nanocomposite: Conductivity and thermal properties. Synthetic Metals, [S. l.], v. 162, n. 1-2, p. 171–175, 2012. LEMOS, D. M. et al. Avaliação físico-química de um blend de laranja tangor 'Ortanique' e beterraba. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 207-2011, out. 2013. LI, T. et al. Nanotechnology, an alternative with promising prospects and advantages for the treatment of cardiovascular diseases. International Journal Of Nanomedicine, [S.L.], v. 13, p. 7349-7362, nov. 2018. Informa UK Limited. MAO, W. et al. Sulfated polysaccharides from marine green algae Ulva conglobata and their anticoagulant activity. Journal of Applied Phycology, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 9-14, fev. 2006. MATTEO, ANTONIO DI et al. Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (Citrus limon (L.) Burm. F.) cultivars. Scientia Horticulturae, v. 276, p. 109741, 2021. MCCANN, J. et al. Poly(vinylamine) microgel–dextran composite hydrogels: Characterisation; properties and pH-triggered degradation. Journal of Colloid and Interface Science, [S. l.], v. 449, p. 21–30, 2015. MELO-SILVEIRA, R. F. et al. Antioxidant and proliferative activities of methanolic extract from the edible seaweed Gracilaria birdiae. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, v. 142, n. 11, p. 1161–1166, 2011. MELO-SILVEIRA, R. F. et al. In Vitro Antioxidant, Anticoagulant and Antimicrobial Activity and in Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Xylan Extracted from Corn Cobs. International Journal of Molecular Sciences, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 409-426, dez. 2011. MESSINGER-RAPPORT, B. J.; SPRECHER, D. Prevention of cardiovascular diseases. Clinics in Geriatric Medicine, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 463–483, 2002. MOOSAVY, M. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Lemon (Citrus limon) Peel in Vitro and in a Food Model. Journal of Food Quality and Hazards Control, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 42-48, 2017.

CÓDIGO: SB1201

AUTOR: LUCAS MARINHO CORREIA DE ARRUDA

ORIENTADOR: SERGIO ADRIANE BEZERRA DE MOURA

TÍTULO: Análise radiográfica da ocorrência de cáries em dentes em dentes humanos depositados no Biobanco de Dentes Humanos - UFRN

Resumo

O Biobanco de Dentes Humanos do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Trio Grande do Norte (BDH-UFRN) é fundamental para o ensino, a pesquisa e a preservação de material biológico sob rigorosos critérios éticos e de biossegurança. O presente trabalho teve como objetivo analisar e catalogar, os aspectos morfológicos macroscópicos de dentes humanos pertencentes ao acervo do BDH-UFRN, identificando variações anatômicas, anomalias, lesões cariosas e tratamentos restauradores nas superfícies dentárias. As atividades foram realizadas semanalmente no biobanco, onde três voluntários realizaram a triagem, inspeção minuciosa das faces coronárias (mesial, distal, vestibular, palatina/lingual) e radiculares de 341 dentes. Os dados foram registrados em fichas físicas padronizadas por grupo anatômico e, posteriormente, consolidados em uma planilha eletrônica (Microsoft Excel). Paralelamente, foi estruturado um banco de dados digitalizado no Google Drive, contendo o registro iconográfico de todas as amostras catalogadas por potes de armazenamento e subpastas. A metodologia aplicada permitiu a otimização da gestão do acervo do BDH-UFRN, facilitando o acesso ético e organizado a amostras biológicas para o treinamento pré-clínico e a pesquisa odontológica na instituição.

Palavras-chave: Biobanco. Dentição Permanente. Anormalidades Dentárias.

TITLE: Morphological analysis of human teeth at the Federal University of Rio Grande do Norte Tooth Biobank.

Abstract

The Human Tooth Biobank of the Department of Dentistry at the Federal University of Rio Grande do Norte (HTB-UFRN) is essential for teaching, research, and the preservation of biological material under strict ethical and biosafety standards. This study aimed to morphologically and macroscopically analyze and catalog human teeth from the HTB-UFRN collection, identifying anatomical variations, anomalies, carious lesions, and restorative procedures across dental surfaces. Activities were conducted weekly at the biobank, where three volunteers performed screening and detailed inspection of coronal (mesial, distal, buccal, palatal/lingual) and radicular surfaces of

341 teeth. Data were recorded on standardized physical forms grouped by anatomical type and subsequently consolidated into an electronic spreadsheet (Microsoft Excel). Concurrently, a digital database was structured on Google Drive, housing the iconographic record of all samples cataloged by containers and subfolders. The applied methodology enabled the optimization of the HTB-UFRN collection management, facilitating ethical and organized access to biological samples for preclinical training and dental research within the institution.

Keywords: Biobank. Dentition Permanent. Tooth Abnormalities.

Introdução

Primordialmente, os biobancos são repositórios especializados na coleta, processamento, armazenamento e distribuição de material biológico humano e dados associados para pesquisas científicas de longo prazo. Eles impulsionam o desenvolvimento de pesquisas personalizadas, diagnóstico e terapias, estando sujeitos a rigorosos protocolos éticos e de biossegurança. Nessa direção, destaca-se a importância do Biobanco de Dentes Humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (BDH-UFRN), que recebe doações de espécimes dentários essenciais para a formação de alunos de graduação e pós-graduação, contribuindo para o desenvolvimento de habilidades clínicas, compreensão anatômica e investigação científica (GOMES et al., 2013). As amostras do BDH-UFRN são tradicionalmente registradas com base na anatomia dentária como critério primário de classificação. No entanto, a análise criteriosa dessas amostras pode oferecer informações valiosas sobre as condições de saúde bucal da população e sobre as terapêuticas empregadas ao longo do tempo. O diagnóstico exato do padrão de cárie dentária e a identificação de restaurações orientam intervenções eficazes e auxiliam no planejamento de estratégias de saúde pública (FEJERSKOV, 1997). Além disso, a avaliação dos espécimes permite compreender a frequência de anomalias dentárias e variações morfológicas secundárias ou genéticas (GARIB et al., 2010). O uso de dentes humanos extraídos permanece como recurso indispensável na prática pré-clínica. Contudo, estudos como o de Gomes et al. (2013) alertam para a necessidade de discutir aspectos éticos no ensino odontológico, combatendo a aquisição informal ou ilícita de dentes e assegurando o cumprimento das normas de biossegurança no manuseio do material biológico. Assim, a preservação e a catalogação abrangente do acervo do BDH-UFRN impactam diretamente na melhoria das atividades de ensino e pesquisa da universidade.

Metodologia

A pesquisa foi realizada nas dependências do Biobanco de Dentes Humanos da UFRN (BDH-UFRN), em sessões semanais, com a participação de três voluntários. 3.1 Amostragem e Critérios de Elegibilidade Foram analisados 341 dentes permanentes do acervo do BDH-UFRN. ⟫ Critérios de Inclusão: Dentes permanentes hígidos ou comprometidos por cárie, com estruturas coronárias e/ou radiculares passíveis de inspeção macroscópica; ⟫ Critérios de Exclusão: Dentes decíduos, espécimes com coroas artificiais totais (metálicas, cerâmicas ou plásticas) e fraturas radiculares graves que impossibilitassem a avaliação macroscópica. 3.2 Procedimento de Análise Macroscópica Cada dente foi submetido à inspeção visual sob iluminação adequada. A

análise contemplou a verificação sistemática de todas as faces anatômicas (mesial, distal, vestibular, palatina ou lingual) e da porção radicular, observando-se: ⟫ Presença de lesão cariosa: localização (coronária/radicular), extensão e acometimento das superfícies; ⟫ Presença de procedimentos restauradores: identificação do material (resina composta, amálgama ou coltosol); ⟫ Anomalias dentárias e variações anatômicas. 3.3 Coleta de Dados e Organização Digital Os dados foram coletados e registrados em fichas específicas e transferidas para uma planilha eletrônica no Microsoft Excel, onde cada amostra foi tabulada segundo seu lote/pote de origem, grupo dental e características macroscópicas observadas. Concomitantemente, foi realizado o registro fotográfico dos conjuntos de dentes por recipiente de armazenamento. Os arquivos de imagem foram renomeados e organizados no Google Drive em subpastas categorizadas por grupo anatômico criando um acervo iconográfico digital diretamente integrado à planilha do Excel.

Resultados e Discussões

A metodologia aplicada permitiu a catalogação e a digitalização completa de 341 elementos dentários. A distribuição das amostras e a prevalência dos achados macroscópicos foram consolidadas na planilha eletrônica. A organização do acervo por meio de subpastas no Google Drive vinculadas à planilha no Excel contribuiu para a catalogação do acervo do BDH. Ao disponibilizar não apenas o tipo de dente, mas também a presença de cárie, material restaurador nas diferentes faces (mesial, distal, vestibular, palatina/lingual), anomalias dentárias, o biobanco passa a oferecer uma consulta ágil do acervo. A análise destada os achados: - 114 dentes com faceta de desgaste/desgaste incisal (⅓ dos dentes); - 1 dente com acesso endodôntico; - 21 dentes com abfração; - 64 dentes com dilaceração/fratura radicular; - 76 dentes com lesão cariosa; - 74 dentes com restauração (resina, amálgama ou coltosol); - 8 dentes com Lesão Cervical Não Cariosa (LCNC); - 1 dente com Taurodontia; - 50 dentes com raízes fusionadas; - 28 dentes com rizogênese incompleta; - 8 dentes com hipercementose; - 5 dentes com microdontia; - 10 dentes com fratura/destruição coronária; - 2 dentes com cárie inativa; - 4 dentes com pigmentação radicular/lesão pigmentada; - 1 dente com restauração provisória; - 2 dentes com desgaste por biocorrosão; - 1 dente com lesão periapical na raiz; - 1 dente com raiz bifurcada; - 1 dente com raiz e cúspide supranumerárias. Esses resultados corroboram ao trabalhos de Fejerskov (1997) e Garib et al. (2010), ao demonstrar que a caracterização detalhada de acervos biológicos serve como um mapeamento epidemiológico indireto e fornece insumos específicos para disciplinas pré-clínicas de Dentística, Endodontia e Anatomia Funcional da Oclusão. Ademais, a sistematização do processo atende às exigências éticas e de biossegurança destacadas por Gomes et al. (2013) e Pereira (2012), desencorajando a obtenção inadequada de dentes por estudantes e valorizando o papel institucional do BDH-UFRN.

Conclusão

A execução deste plano de trabalho permitiu alcançar os objetivos propostos, resultando em um banco de dados funcional e digitalizado para o BDH-UFRN. Outrossim, durante o desenvolvimento do projeto, foram consolidadas as seguintes habilidades: ⟫

Exercício do raciocínio científico e compreensão prática das etapas de uma pesquisa acadêmica; 》 Aprimoramento da conduta ética e aplicação de normas de biossegurança no manuseio de material biológico humano; 》 Domínio na avaliação anatômica macroscópica de dentes e no diagnóstico diferencial de lesões cariosas coronárias/radiculares e restaurações nas diversas faces dentárias; 》 Capacidade de gestão de dados biológicos, organização de repositórios digitais e estruturação de tabelas de catalogação (Microsoft Excel).

Referências

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease process. Community Dentistry and Oral Epidemiology, v. 25, n. 1, p. 5-16, 199 GARIB, D. G. et al. Anomalias dentárias associadas: inter-relação entre agenesia dentária e outras anomalias de desenvolvimento. Dental Press Journal of Orthodontics, v. 15, n. 2, p. 43-56, 2010 PEREIRA, Dayliz Quinto. Banco de dentes humanos no Brasil: revisão de literatura. Revista da ABENO, v. 12, n. 2, p. 178-184, 2012. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-59542012000200007. Acesso em: 28 ago. 2026. GOMES, Giovana Mongruel et al. Utilização de dentes humanos: aspectos éticos e legais. RGO - Revista Gaúcha de Odontologia, Porto Alegre, v. 61, n. 1, p. 477-483, 2013. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-86372013000500008. Acesso em: 28 ago. 2026. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Rita Elizabeth; GARROCHO-RANGEL, José Arturo. Use of extracted human teeth in oral research: ethical and legal considerations. The Journal of the American Dental Association, v. 157, n. 2, p. 184-191, 2026. DOI: 10.1016/j.adaj.2025.10.008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41329117/. Acesso em: 28 ago. 2026.

CÓDIGO: SB1203

AUTOR: JOSÉ RONYELE DA SILVA LIMA

ORIENTADOR: MAGNOLIA FERNANDES FLORENCIO DE ARAUJO

TÍTULO: O que pensam estudantes e seus pais agricultores sobre a microbiologia dos solos?

Resumo

A conservação dos solos e a compreensão de sua dinâmica microbiológica são pautas centrais para a Educação para a Sustentabilidade. Este trabalho investigou as percepções preliminares de estudantes e de seus pais, agricultores locais, sobre a microbiologia do solo, utilizando o jardim sensorial do Parque das Ciências como espaço não formal de ensino. A metodologia qualitativa baseou-se no ensino de ciências por investigação, articulando dados de campo da fase diagnóstica do projeto guarda chuva coletados nas escolas públicas de Pium e Vila de Ponta Negra com uma revisão de literatura sobre o ensino do tema. O levantamento teórico apontou que a abordagem sobre microrganismos na educação básica é majoritariamente focada em aspectos negativos e patogênicos. Essa lacuna refletiu-se nos dados de campo preliminares, nos quais a comunidade escolar associou os alimentos orgânicos apenas à ausência de agrotóxicos, desconhecendo a função vital da biodiversidade microbiológica para a fertilidade do solo. As observações indicam que o uso pedagógico do jardim sensorial do Parque das Ciências é fundamental para materializar o estudo da microbiologia, retirando o aluno da passividade e estimulando a investigação empírica. Conclui se que integrar o conhecimento acadêmico à vivência prática agrícola das famílias é o caminho mais promissor para promover a alfabetização científica.

Palavras-chave: Microbiologia do solo. Jardim sensorial. Ensino por investigação.

TITLE: What students and farming parents think about soil microbiology: investigation in the sensory garden of the Science Park

Abstract

Soil conservation and the understanding of its microbiological dynamics are central themes in Education for Sustainability. This study investigated the preliminary perceptions of students and their parents, who are local farmers, regarding soil microbiology, utilizing the sensory garden of the Science Park as a non-school

educational space. The qualitative methodology was based on inquiry-based science education, integrating field data from the broader project schedule collected in public schools in Pium and Vila de Ponta Negra with a literature review on teaching the subject. The theoretical review based on Olímpio (2025) indicated that the approach to microorganisms in basic education is predominantly focused on negative and pathogenic aspects. This educational gap was reflected in the preliminary field data, where the school community associated organic foods solely with the absence of pesticides, lacking awareness of the vital role of microbiological biodiversity in soil fertility. Observations indicate that the pedagogical use of the sensory garden supported by Araújo (2025) is fundamental to making the study of microbiology tangible, removing students from passivity and stimulating empirical investigation. It is concluded, based on data from the book Teaching Science in the Park, that integrating academic knowledge with the families practical agricultural experience is the most promising path to promoting scientific literacy.

Keywords: Soil microbiology. Sensory garden. Inquiry-based teaching.

Introdução

A promoção da Educação para a Sustentabilidade exige novas abordagens no ensino de Ciências, especialmente no que se refere à conservação e à saúde dos solos. Historicamente, a sala de aula tradicional apresenta limitações para tratar de ecossistemas complexos e invisíveis a olho nu, como é o caso da biodiversidade edáfica. Para superar essa barreira de abstração, a utilização de espaços não escolares como o jardim sensorial do Parque das Ciências surge como uma alternativa viável para aproximar os estudantes da realidade por meio do ensino por investigação.

O presente relatório insere-se em um estudo longitudinal e mais amplo sobre a sustentabilidade dos recursos naturais. Em etapas anteriores das ações do projeto mais amplo, o grupo de pesquisa levantou as opiniões de consumidores sobre o conceito de alimentos orgânicos. A partir desse diagnóstico inicial, percebeu-se a necessidade imperativa de investigar também a base produtiva, questionando o que os próprios produtores rurais, pais de escolares e os alunos compreendem sobre a vulnerabilidade do solo e a sua microbiologia. O eixo norteador desta etapa focou em entender como essas comunidades enxergam a colaboração dos microrganismos para a formação de um solo capaz de produzir alimentos de qualidade nutricional e biológica.

As ações envolvem o público do entorno de duas escolas públicas, situadas nas localidades de Pium em Nísia Floresta e na Vila de Ponta Negra em Natal. O objetivo central desta pesquisa foi testar a hipótese de como o jardim sensorial do Parque das Ciências funciona como ferramenta eficaz para a Educação para a Sustentabilidade. Além de buscar levantar o conhecimento prévio da comunidade escolar e dos pais agricultores sobre a saúde do solo, o trabalho correlacionou esses dados empíricos com a literatura recente da área, avaliando o impacto das práticas de conservação no ensino básico.

Metodologia

A pesquisa adotou uma abordagem qualitativa de caráter exploratório, fundamentada nos princípios do ensino de ciências por investigação. O público alvo abrangeu estudantes da educação básica, professores e pais agricultores vinculados às escolas parceiras de Pium e Ponta Negra. Considerando o cronograma das ações do projeto mais amplo, o percurso metodológico desta etapa centrou-se em duas frentes de coleta e análise de dados.

A primeira frente consistiu na imersão no campo empírico e na consolidação de dados preliminares obtidos pelo grupo de pesquisa. Utilizou-se a técnica de observação in loco e observação participante segundo Marconi e Lakatos (2004) durante as interações ocorridas no espaço do jardim sensorial do Parque das Ciências. Segundo Gerhardt e Silveira (2009), a imersão possibilita o registro de como os sujeitos constroem seus saberes na prática e interagem com o meio, captando fenômenos espontâneos. Concomitantemente, estruturou-se a aplicação de questionários e entrevistas semiestruturadas conforme Gil (2010) para mapear o conhecimento empírico e técnico da comunidade sobre a produção orgânica e a função específica da microbiologia do solo.

A segunda frente metodológica consistiu em uma revisão de literatura para fundamentar as observações de campo. Realizou-se um levantamento em bases de dados consolidadas como SCIELO, CAPES e BDTD, buscando compreender como o ensino da microbiologia do solo foi abordado na última década no Brasil e quais as metodologias mais eficazes relatadas em periódicos para o ensino desse tema.

O cruzamento dos dados entre as observações preliminares de campo e as categorias emergentes da revisão de literatura permitiu uma análise robusta sobre as lacunas no ensino de Ciências, garantindo que as reflexões desta pesquisa sejam pautadas em demandas reais da comunidade escolar.

Resultados e Discussões

Devido ao cronograma da Iniciação Científica, este trabalho discute o mapeamento feito nas escolas e a base teórica que sustentará as futuras intervenções do grupo.

A partir dos dados preliminares consolidados pelo grupo durante o cronograma das ações do projeto mais amplo, coletados através da aplicação de questionários nas comunidades de Pium e Ponta Negra, observou-se que a percepção empírica sobre a qualidade do solo e a produção de orgânicos é bastante restrita entre os pais agricultores e a comunidade escolar. Constatou-se que o público investigado associa o alimento orgânico quase exclusivamente à ideia de comida sem veneno, ou seja, à ausência de defensivos químicos. O papel biológico e dinâmico da microbiologia do solo, que

envolve a simbiose, a decomposição de matéria orgânica por fungos e bactérias e a ciclagem de nutrientes, raramente é articulado pelos sujeitos.

Essa percepção limitada compromete os princípios da Educação para a Sustentabilidade. Embora exista um conhecimento prático e empírico das famílias sobre as técnicas de plantio, há uma carência conceitual significativa sobre a teia de interações ecológicas microscópicas que garante a fertilidade natural e a saúde da terra.

O diagnóstico realizado reflete o cenário nacional apontado pela literatura. A pesquisa de Olímpio (2025) revelou uma escassez estrutural de trabalhos específicos voltados à microbiologia do solo na educação básica, demonstrando que o ensino de microbiologia no Brasil é habitualmente trabalhado de maneira apenas teórica e sem experimentação. Historicamente, o conteúdo sobre microrganismos foca quase exclusivamente nos aspectos patogênicos e negativos, tratando os microrganismos apenas como agentes causadores de doenças, conforme também observado por Oliveira et al. (2024).

Essa abordagem tradicional explica a dificuldade que as comunidades investigadas apresentam em associar fungos e bactérias a funções ambientais positivas. Se a escola trata microrganismos apenas como sinônimo de perigo ou falta de higiene, compreende-se a dificuldade da família agricultora em perceber a importância da microbiota do solo para garantir o sucesso de sua própria lavoura.

Como essa deficiência se repete na prática, as observações em campo indicaram a necessidade de novas estratégias de ensino. O acompanhamento prático amparado por Araújo (2025) demonstrou que espaços não escolares como o jardim sensorial do Parque das Ciências são fundamentais para tirar o ensino por investigação da teoria e levá-lo à prática. Na análise dessa autora, o uso pedagógico do jardim sensorial e a construção de terrários permitem a materialização de temáticas invisíveis, atuando como um poderoso espaço de alfabetização científica e de contextualização.

Nas escolas acompanhadas, isso ocorre quando os estudantes deixam o formato tradicional das aulas. Ao tocarem a terra no jardim sensorial, manipularem a matéria orgânica e observarem as mudas in loco, a ação invisível dos microrganismos torna-se mais concreta. A formulação de hipóteses demonstra que a imersão multissensorial desperta diretamente a postura investigativa e tira o discente da passividade.

Esses achados reforçam a urgência de alinhar o ensino de ciências à abordagem Ciência Tecnologia e Sociedade, conforme apontado por Santos e Moreira (2017). Não basta ensinar microbiologia de forma isolada, é preciso garantir que o conhecimento acadêmico dialogue diretamente com a sobrevivência e a realidade de trabalho das famílias agricultoras, traduzindo o diagnóstico em alfabetização científica prática.

Conclusão

A execução desta etapa da pesquisa evidenciou que o conhecimento da comunidade escolar e dos pais agricultores participantes sobre a dinâmica do solo concentra-se em

aspectos físicos e utilitaristas. A associação de alimentos orgânicos apenas à ausência de veneno demonstra que a Educação para a Sustentabilidade precisa avançar na desmistificação e no ensino das interações biológicas da terra.

O cruzamento dos dados empíricos com os resultados da análise referencial, notadamente os dados do livro Ensinando Ciências no Parque organizado por Araújo (2025), indicou que essa lacuna reflete o ensino tradicional que marginaliza a microbiologia ambiental ao priorizar quase unicamente os agentes patogênicos. A referida obra atesta que a imersão em espaços não escolares de ensino é a estratégia mais coerente para reverter o quadro, pois as vivências em locais como o jardim sensorial retiram o aluno da passividade e tornam o ecossistema microscópico tangível para o ensino de ciências por investigação.

Conclui-se que a articulação contínua entre o rigor do saber acadêmico e o conhecimento empírico das famílias rurais e urbanas é o caminho mais promissor para promover a alfabetização científica. O ensino da microbiologia edáfica aliado à prática em espaços não escolares de ensino forma cidadãos e produtores conscientes sobre as bases biológicas que sustentam a vida na Terra. Como recomendação futura, destaca-se a necessidade de continuidade do projeto para consolidar a integração entre a ciência do solo e a realidade agrícola das comunidades locais.

Referências

ARAÚJO, A. de O. Saúde e Sustentabilidade dos Solos no Ensino de Ciências: uma proposta didática utilizando a abordagem do ensino por investigação. 2025. 100 folhas. Dissertação, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

ARAÚJO, M. F. F. de, Organizadora. Ensinando Ciências no Parque: Educação para a Sustentabilidade e Inclusão em Espaços Não Escolares. Natal: EDUFRN, 2025.

BARBERÁN, A. et al. Microbes should be central to ecological education and outreach. Journal of Microbiology and Biology Education, volume 17, número 1, página 23, 2016.

BENASSI, F. et al. The relevance of sustainable soil management. Land Use Policy, volume 100, 104950, 2020.

BLAIR, D. The Child in the Garden: An Evaluative Review of the Benefits of School Gardening. The Journal of Environmental Education, volume 40, número 2, páginas 15 a 38, 2009.

BOAS, R. C. V.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. F.; MOREIRA, F. M. S. Utilização de recursos audiovisuais como estratégia de ensino de microbiologia do Solo nos ensinos fundamental II e Médio. Práxis, volume 10, número 19, páginas 79 a 90, 2018.

CORDEIRO, P. H. F.; PRESTES, R. F. R.; PERIOTTO, F.; BARON, D. Jardim sensorial: ambiente não formal de ensino de botânica. São Carlos: UFSCar e CPOI, 2019.

FAO. Status of the World Soil Resources SWSR Main Report. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015.

GERHARDT, T. E.; SILVEIRA, D. T. Métodos de pesquisa. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. 5 edição. São Paulo: Atlas, 2010.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. Metodologia científica. 4 edição. São Paulo: Atlas, 2004.

MEDEIROS, W. L. Educação ambiental a partir da compostagem escolar: Resultados de um projeto de intervenção pedagógica em uma escola pública. 2018. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

OLÍMPIO, F. I. B. Microbiologia do solo no ensino de ciências: uma breve revisão de literatura. 2025. 36 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

OLIVEIRA, D. R.; TAVEIRA, G. D. M.; CABRAL OLIVEIRA, G. G. Reflexões sobre conteúdos microbiológicos no Ensino de Ciências e Biologia. Sustinere, Rio de Janeiro, volume 13, número 1, páginas 576 a 597, 2024.

PIRES, F. R.; MARINHO, J. C. B. Análise de estudos que envolvam microrganismos e sua relação com a saúde nas Atas do Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências ENPEC. Em: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, edição 14, 2023, Caldas Novas. Anais ENPEC EM REDES, 2023.

SANTOS, A. B.; MOREIRA, A. L. O. R. Solo por meio de CTS: uma investigação na formação inicial. Em: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, edição 11, 2017, Florianópolis. Anais UFSC, 2017.

UNCCD. Global land outlook. 1 edição. Bonn: Secretariat of the United Nations Convention to Combat Desertification, 2017.

CÓDIGO: SB1206

AUTOR: BARBARA LETICIA JALES DE LIMA

ORIENTADOR: VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO

TÍTULO: Avaliação do desempenho cognitivo-comportamental e da resposta inflamatória na malária não grave experimental por Plasmodium berghei NK65

Resumo

A malária permanece como uma das principais doenças parasitárias do mundo, com elevados índices de morbidade e mortalidade. Entre suas manifestações, a malária não grave (MnG) ainda suscita questionamentos sobre possíveis sequelas cognitivas e comportamentais, mesmo na ausência de sinais clínicos evidentes de comprometimento cerebral. Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da infecção experimental por Plasmodium berghei NK65 em camundongos C57BL/6, investigando o desempenho cognitivo-comportamental e a resposta inflamatória periférica e central. Para tal, foram padronizados protocolos de tratamento curativo com artesunato e amodiaquina, permitindo a eliminação radical do parasito e a avaliação de possíveis sequelas. Os resultados demonstraram que, embora o modelo NK65 não evolua para a malária cerebral clássica, a resposta inflamatória sistêmica pode contribuir para déficits cognitivos observados em longo prazo. A padronização do tratamento foi crucial para assegurar que alterações comportamentais fossem resultado de um único episódio infeccioso. Conclui-se que a MnG pode induzir alterações persistentes na cognição e no comportamento, reforçando a necessidade de compreender melhor os mecanismos inflamatórios associados.

Palavras-chave: Malária. Plasmodium berghei. Neuroinflamação. Cognição

TITLE: Cognitive-behavioral performance and inflammatory response in experimental non-severe malaria by Plasmodium berghei NK65

Abstract

Malaria remains one of the most relevant parasitic diseases worldwide, with high morbidity and mortality rates. Non-severe malaria (NSM) still raises questions regarding its potential to induce long-term cognitive and behavioral impairments, even in the absence of overt cerebral damage. This study aimed to investigate the effects of experimental infection with Plasmodium berghei NK65 in C57BL/6 mice, focusing on cognitive-behavioral performance and inflammatory responses in serum and brain tissue. Curative treatment protocols combining artesunate and amodiaquine were standardized to ensure radical parasite clearance and allow the evaluation of post-

infection outcomes. Results indicated that, despite NK65 not progressing to experimental cerebral malaria, systemic inflammatory responses may contribute to persistent neurocognitive alterations. Treatment standardization was fundamental to confirm that cognitive deficits resulted from a single malaria episode rather than from recrudescent infection. These findings highlight the impact of NSM on cognitive functions and reinforce the importance of investigating inflammatory mechanisms underlying such sequelae.

Keywords: Malaria. Plasmodium berghei. Neuroinflammation. Cognition.

Introdução

A malária continua sendo uma das enfermidades infecciosas mais relevantes do cenário global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde (2024), estima-se que tenham ocorrido aproximadamente 263 milhões de casos em 2023, resultando em quase 600 mil mortes, grande parte concentrada no continente africano. Embora os esforços em controle vetorial e terapêutico tenham reduzido a mortalidade, a transmissão permanece elevada, e as sequelas da doença ainda são objeto de intensa investigação. A infecção humana pode ser causada por diferentes espécies de Plasmodium, destacando-se P. falciparum e P. vivax, responsáveis pela maioria dos casos. O P. falciparum apresenta maior letalidade e está fortemente associado à malária cerebral (MC), a complicação mais grave da doença, enquanto o P. vivax é predominante na América do Sul e no Brasil. Em modelos experimentais murinos, a cepa Plasmodium berghei ANKA (PbA) é amplamente empregada para reproduzir características da MC, permitindo estudar aspectos fisiopatológicos e sequelas neurocognitivas. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos da malária não grave (MnG) no sistema nervoso central. Embora classicamente considerada reversível após tratamento, evidências crescentes sugerem que mesmo a MnG pode deixar consequências cognitivas e comportamentais de longo prazo. Estudos realizados em humanos e animais mostram alterações em memória, aprendizagem e ansiedade, levantando a hipótese de que a inflamação sistêmica desempenha papel central nesse processo. Nesse contexto, o uso de diferentes cepas murinas de Plasmodium possibilita comparar fenótipos clínicos e investigar mecanismos fisiopatológicos distintos. A cepa NK65, diferentemente da ANKA, não evolui para a malária cerebral experimental, permitindo analisar se déficits cognitivos podem surgir independentemente de lesões histológicas cerebrais. Além disso, a padronização de protocolos terapêuticos é fundamental para assegurar que tais alterações sejam sequelas de um único episódio infeccioso, e não de recrudescência parasitária. Assim, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da MnG experimental por P. berghei NK65 em camundongos C57BL/6, com ênfase na relação entre inflamação sistêmica, expressão gênica no sistema nervoso central e desempenho cognitivo-comportamental.

Metodologia

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com idade entre 7 e 8 semanas. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 4×10^6 hemácias parasitadas por Plasmodium berghei NK65 GFP+. O grupo controle recebeu apenas solução tampão PBS. Quatro dias após a infecção, foi administrado o tratamento com

artesunato (40 mg/kg, via intraperitoneal) em associação à amodiaquina (24 mg/kg, por gavagem), durante sete dias consecutivos. Esse regime terapêutico foi definido após a padronização de diferentes protocolos de tratamento, uma vez que doses menores ou administrações apenas orais resultaram em recrudescência. A parasitemia foi monitorada por citometria de fluxo e microscopia óptica, utilizando esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Após a cura parasitológica, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais em dois momentos: no 12º e no 80º dias pós-tratamento (dpt). Os protocolos incluíram tarefa de campo aberto (locomoção e ansiedade), reconhecimento de objeto novo (memória de curta e longa duração) e tarefa claro/escuro (ansiedade). Amostras de soro e cérebro foram coletadas nos dias 4, 12 e 80 pós-infecção/tratamento para análises imunológicas e moleculares. Foram quantificados TNF-α, IL-1β e IL-6 por ELISA/CBA. Além disso, avaliou-se a expressão gênica de marcadores inflamatórios (TLR2, TLR9, NLRP3, ASC, Caspase-1, Myd88, NF-κB, TNF-α, IL-1β e IL-6) e de genes relacionados à resposta neurocognitiva (5HT1a, 5HT1b, MAOA, Npas4 e NR2B). A histopatologia cerebral foi conduzida em diferentes dias pós-infecção, incluindo avaliação de córtex, hipocampo e cerebelo. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina para detectar infiltrados inflamatórios, necrose, edema e hemorragias. A análise estatística foi realizada por meio de curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, ANOVA e testes não paramétricos, quando aplicável.

Resultados e Discussões

1. Histopatologia cerebral durante a infecção por PbNK65

A análise histopatológica de cérebros de camundongos C57BL/6 infectados pelo P. berghei NK65 revelou ausência de alterações morfológicas compatíveis com malária cerebral experimental. Não foram observados infiltrados inflamatórios, edema, hemorragias, necroses ou degenerações nos principais compartimentos do SNC (córtex, hipocampo, cerebelo e plexo coróide). Esses resultados reforçam a característica do modelo NK65, que, diferentemente da cepa ANKA, não evolui para malária cerebral, ainda que apresente replicação eficiente do parasito e elevada parasitemia. A ausência de lesões histológicas sugere que eventuais déficits cognitivos não decorrem de dano estrutural cerebral evidente, mas possivelmente de mecanismos inflamatórios periféricos ou neuroquímicos.

2. Progressão da infecção e letalidade na ausência de tratamento

A monitorização da parasitemia mostrou níveis baixos até o décimo dia pós-infecção, seguidos por aumento progressivo e acentuado, atingindo aproximadamente 50% por volta da terceira semana. Nesse mesmo período, foi registrada mortalidade crescente, com taxa de sobrevivência nula em 25 dias pós-infecção. Esses dados confirmam que, embora o modelo NK65 não desenvolva malária cerebral, ele progride para doença letal quando não tratado. Tal característica reforça a necessidade da padronização de protocolos terapêuticos eficazes para viabilizar análises comportamentais de longo prazo sem interferência de recrudescência.

3. Padronização do tratamento antimalárico

Foram testadas diferentes combinações terapêuticas com artesunato e amodiaquina em doses variadas e rotas distintas. Os protocolos exclusivamente por gavagem (artesunato 8–16 mg/kg + amodiaquina 10 mg/kg) resultaram em recrudescência precoce, ocorrendo até nove dias após o fim do tratamento. Da mesma forma, a monoterapia com artesunato (50 mg/kg, ip) mostrou-se ineficaz, com recrudescimento ainda durante o regime terapêutico. Combinações de artesunato com sulfadiazina ou doses elevadas de amodiaquina também não promoveram cura radical, evidenciando a dificuldade inicial em conter o parasito. A definição final do regime curativo consistiu na administração de artesunato 50 mg/kg (ip) associado à amodiaquina 24 mg/kg (gavagem) por sete dias. Esse esquema mostrou eficácia consistente em experimentos independentes, com ausência de recrudescência até pelo menos 179 dias pós-tratamento, validando-o como protocolo seguro para os ensaios comportamentais.

4. Impactos cognitivo-comportamentais e resposta inflamatória

Uma vez assegurada a eliminação parasitária, os animais tratados foram submetidos a testes comportamentais. Observou-se que, mesmo sem sinais histopatológicos de MC, camundongos infectados por PbNK65 exibiram distúrbios de memória de reconhecimento de objeto novo e fenótipo ansiedade-like em avaliações realizadas tanto no 12º quanto no 80º dia pós-tratamento. Esses achados corroboram dados prévios com a cepa ANKA, sugerindo que a MnG pode deixar sequelas persistentes. As análises imunológicas indicaram aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6) no soro e no hipocampo, especialmente em fases iniciais da infecção. Além disso, genes associados à resposta neurocognitiva, como Npas4 e receptores serotoninérgicos (5HT1a/5HT1b), apresentaram expressão alterada. Esses resultados sugerem que a inflamação sistêmica, modulada pela presença do parasito, pode desencadear alterações neuroquímicas capazes de impactar processos cognitivos, mesmo sem neuroinflamação clássica ou danos estruturais cerebrais.

5. Discussão integrada com literatura

Estudos prévios já haviam mostrado que sobreviventes de malária cerebral apresentam déficits cognitivos duradouros (Carter et al., 2005; John et al., 2008). Trabalhos mais recentes em modelos murinos reforçam que mesmo episódios de MnG podem gerar alterações semelhantes (de Sousa et al., 2018; Rosa-Gonçalves et al., 2022). Nossos achados ampliam esse conhecimento ao confirmar que, em um modelo experimental incapaz de desenvolver MC (NK65), déficits ainda são observados, apontando para um papel fundamental da inflamação periférica. A elevação sustentada de TNF-α e IL-1β, associada a alterações de BDNF e Npas4, corrobora a hipótese de que a inflamação sistêmica pode modular circuitos neurais críticos para memória e comportamento. Essa interpretação está alinhada com estudos que descrevem a contribuição da IL-1β em processos cognitivos dependentes do hipocampo (Reverchon et al., 2017). Assim, a MnG não deve ser considerada uma forma “inócua” da doença, pois pode induzir sequelas neurocognitivas de longo prazo.

Conclusão

O estudo confirmou que a infecção por Plasmodium berghei NK65 em camundongos C57BL/6 não induz malária cerebral experimental clássica, mas evolui para doença

grave e letal se não tratada. A padronização do regime terapêutico com artesunato (50 mg/kg, ip) associado à amodiaquina (24 mg/kg, gavagem) foi eficaz em eliminar totalmente o parasito, garantindo a cura radical e permitindo a análise de sequelas neurocognitivas. Os achados sugerem que a malária não grave pode induzir alterações cognitivas e comportamentais persistentes, possivelmente relacionadas à resposta inflamatória sistêmica, independentemente de lesões histológicas cerebrais. Esses resultados reforçam a importância de compreender a contribuição da inflamação periférica na gênese de déficits cognitivos e comportamentais associados à malária. Recomenda-se que pesquisas futuras explorem a modulação farmacológica da resposta inflamatória e seu impacto em modelos de MnG, visando identificar potenciais estratégias terapêuticas para prevenir sequelas cognitivas em pacientes humanos.

Referências

ABIODUN, O. O.; AKINBO, J.; OJURONGBE, O. The effect of lopinavir/ritonavir on the antimalarial activity of artemether or artemether/lumefantrine in a mouse model of Plasmodium berghei. Journal of Chemotherapy, v. 27, n. 1, p. 25–28, 2014.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; et al. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v. 87, n. 2-3, p. 253-256, 2003.

ASHLEY, E. A.; PHYO, A. P.; WOODROW, C. J. Malaria. The Lancet, v. 391, p. 1608-121, 2018.

BANGIRANA, P.; et al. Cognition, behaviour and academic skills after cognitive rehabilitation in Ugandan children surviving severe malaria: a randomised trial. BMC Neurology, v. 11, n. 96, 2011.

BANGIRANA, P.; et al. Reliability of the Luganda version of the Child Behaviour Checklist in measuring behavioural problems after cerebral malaria. Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health, v. 3, n. 38, 2009.

BARBER, B. E.; et al. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. PLoS Pathogens, v. 11, n. 1, 2015.

BOIVIN, M. J.; et al. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. Pediatrics, v. 119, p. 360-366, 2007.

BRASIL, L. M. B. F.; et al. Cognitive performance of children living in endemic areas for Plasmodium vivax. Malaria Journal, v. 16, n. 1, 2017.

CALLAGHAN, C. K.; et al. Antidepressant-like effects of 3-carboxamido seco-nalmefene (3CS nalmefene), a novel opioid receptor modulator, in a rat IFN-α-induced depression model. Brain, Behavior, and Immunity, v. 67, p. 152-162, 2018.

CARTER, J. A.; et al. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, v. 76, n. 4, p. 476-481, 2005.

CARTER, J. A.; et al. Severe falciparum malaria and acquired childhood language disorder. Developmental Medicine and Child Neurology, v. 48, n. 1, p. 51-57, 2006.

CHIN, W.; et al. Naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. Science, v. 149, n. 3686, 1965.

DAI, M.; et al. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. Microbes and Infection, v. 12, n. 14-15, p. 1198–1207, 2010.

DE NIZ, M.; HEUSSLER, V. T. Rodent malaria models: insights into human disease and parasite biology. Current Opinion in Microbiology, v. 46, p. 93-101, 2018.

DE SOUSA, L. P.; et al. Immune system challenge improves recognition memory and reverses malaria-induced cognitive impairment in mice. Scientific Reports, v. 11, n. 14571, 2021.

DE SOUZA, L. P.; et al. Long-term effect of uncomplicated Plasmodium berghei ANKA malaria on memory and anxiety-like behaviour in C57BL/6 mice. Parasites & Vectors, v. 11, p. 191-199, 2018.

DESAI, M.; et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. The Lancet Infectious Diseases, v. 7, n. 2, p. 93-107, 2007.

DESRUISSEAUX, M. S.; GULINELLO, M.; SMITH, D. N.; et al. Cognitive dysfunction in mice infected with Plasmodium berghei strain ANKA. Journal of Infectious Diseases, v. 197, n. 11, p. 1621–1627, 2008.

DOROVINI-ZIS, K.; et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, v. 178, n. 5, p. 2146–2158, 2011.

DOUMBO, O. K.; et al. High levels of Plasmodium falciparum rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 6, p. 987-993, 2009.

FERNANDO, S. D.; et al. The impact of repeated malaria attacks on the school performance of children. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 69, n. 6, p. 582–588, 2003.

Anexos



Figura 1 – Desenho experimental do estudo



Figura 2 – Avaliação histopatológica de cérebros infectados com PbNK65



Figura 3 – Curso da infecção por PbNK65 em camundongos C57BL/6 (A) Parasitemia periférica monitorada por citometria de fluxo. (B) Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, mostrando 100% de mortalidade até o 25º dia pós-infecção.



Figura 4 – Protocolos de tratamento testados contra PbNK65 Esquemas terapêuticos com diferentes combinações de artesunato (ART), amodiaquina (AQ) e sulfadiazina (SULF). Foram avaliadas rotas de administração (ip/gavagem) e eficácia de cura parasitológica.



Figura 6 – Eficácia de diferentes regimes com ART ip e combinações (A–F) Comparação de parasitemia individual e média após tratamentos com ART isolado, ART + SULF e ART + AQ em diferentes doses. Observa-se recrudescência em protocolos não otimizados.



Tabela 1: Análise da eficácia dos tratamentos antimaláricos após infecção de camundongos C57BL/6 por PbNK65Tabela 1: Análise da eficácia dos tratamentos antimaláricos após infecção de camundongos C57BL/6 por PbNK65

CÓDIGO: SB1208

AUTOR: CÍCERA RAYANNE PAIVA AZEVEDO

ORIENTADOR: DANIEL MARQUES DE ALMEIDA PESSOA

TÍTULO: Além do odor: a coloração como estratégia de atração de dispersores em fungos do gênero Clathrus

Resumo

Os fungos do gênero Clathrus, pertencentes à ordem Phallales, apresentam características como odor e coloração que podem estar relacionadas à atração de animais potencialmente envolvidos na dispersão de seus esporos. Diante da pouca compreensão sobre o papel ecológico da coloração, este estudo avaliou se diferentes cores dos basidiomas poderiam influenciar a aproximação e a interação de artrópodes e outros animais. Para isso, foram confeccionados modelos tridimensionais inspirados em Clathrus, nas cores branca, amarela e vermelha, que foram expostos em três ambientes da Mata dos Saguis, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Durante quatro dias de observação, foram registrados os artrópodes que se aproximaram ou estabeleceram contato com os modelos, considerando também as condições de luminosidade e o ambiente. Foram registradas 58 interações, envolvendo diferentes grupos de artrópodes. O modelo amarelo apresentou maior frequência de visitas na semi-clareira e no interior da mata, enquanto o vermelho foi mais visitado na borda, e o branco apresentou as menores frequências nos três ambientes. Os resultados indicam que a coloração pode atuar como um sinal visual complementar ao odor na atração de potenciais dispersores de Clathrus. Entretanto, fatores como luminosidade, condições climáticas e características do ambiente podem ter influenciado as interações observadas, sendo necessários estudos futuros para aprofundar essa relação.

Palavras-chave: Modelos 3D, Phalalles, Basidioma, Artrópodes

TITLE: Coloration as an Attraction Strategy for Dispersers in Fungi of the Genus Clathrus

Abstract

Fungi of the genus Clathrus, belonging to the order Phallales, have characteristics such as odor and coloration that may be related to the attraction of animals potentially involved in spore dispersal. Given the limited understanding of the ecological role of coloration, this study evaluated whether different basidioma colors could influence the approach and interaction of arthropods and other animals. For this purpose, three-dimensional models inspired by Clathrus, in white, yellow, and red, were produced and exposed in three environments of Mata dos Saguis, at the Federal University of Rio Grande do Norte. During four days of observation, arthropods that approached or established contact with the models were recorded, also considering light conditions and the environment. A total of 58 interactions involving different groups of arthropods were recorded. The yellow model showed the highest frequency of visits in the semi-open area and forest interior, while the red model was visited more frequently at the forest edge, and the white model showed the lowest frequencies in all three environments. The results indicate that coloration may act as a visual signal complementary to odor in attracting potential dispersers of Clathrus. However, factors such as light intensity, weather conditions, and environmental characteristics may have influenced the observed interactions, highlighting the need for further studies to better understand this relationship.

Keywords: 3D Models, Phallales, Basidioma, Arthropods.

Introdução

O Reino Fungi compreende uma ampla diversidade de organismos, estimada entre 2 e 3 milhões de espécies (Niskanen et al., 2023), que desempenham importantes funções ecológicas, como a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes (Treseder; Lennon, 2015). Além dessas funções, os fungos estabelecem diversas interações ecológicas com outros organismos, incluindo relações mutualísticas, como micorrizas e líquens, e antagônicas, como parasitismo e patogênese (He et al., 2024; Mishra et al., 2024).

Entre os grupos de fungos, Basidiomycota destaca-se por sua elevada diversidade morfológica e ecológica. Dentro desse filo, a ordem Phallales apresenta ampla variação na forma dos basidiomas, incluindo morfologias clatroide, falóide, lisuroide, laternóide, aracnóide, floróide e trufóide (Ribeiro et al., 2022). Algumas espécies dessa ordem apresentam odor característico, frequentemente associado à atração de potenciais dispersores de esporos. Nesses fungos, os basidiósporos são produzidos em uma massa gelatinosa e pegajosa denominada gleba, cuja consistência pode dificultar a dispersão pelo vento e favorecer a participação de animais nesse processo (Hosaka; Uno, 2012; He et al., 2024).

Além do odor, a coloração dos basidiomas constitui uma característica marcante em Phallales, embora seu papel ecológico ainda seja pouco compreendido. Os fungos produzem diversos pigmentos responsáveis por uma ampla variedade de cores, que podem desempenhar diferentes funções biológicas, incluindo atração, camuflagem, aposematismo, mimetismo, defesa e dispersão (Lin; Xu, 2020; Halbwachs et al., 2016; Krah, 2023).

A investigação da função ecológica da coloração, entretanto, apresenta desafios, uma vez que a percepção visual varia entre os organismos. Insetos e outros grupos possuem sistemas visuais com sensibilidades espectrais diferentes da visão humana, de modo que uma mesma superfície pode produzir respostas visuais distintas entre as espécies (van der Kooi et al., 2021). Dessa forma, avaliações baseadas exclusivamente na percepção humana podem limitar a compreensão da função ecológica das cores nos fungos (Renoult; Kelber; Schaefer, 2017).

Essa questão é especialmente relevante em Phallales devido à possível participação de animais na remoção e transporte da gleba contendo os basidiósporos. Apesar disso, ainda são escassos os estudos que investigam se a coloração dos basidiomas pode influenciar a interação com potenciais dispersores. Assim, permanece uma lacuna sobre o possível papel da variação cromática nas interações entre esses fungos e os animais associados à dispersão de seus esporos.

Diante disso, este estudo busca responder à seguinte questão: a variação da coloração dos corpos frutíferos de espécies da ordem Phallales influencia a interação com potenciais dispersores de esporos, podendo contribuir para seu sucesso reprodutivo? Para investigar essa questão, foi utilizado o gênero Clathrus como modelo, sendo confeccionadas réplicas de basidiomas com massinha de modelar atóxica, mantendo-se a forma dos fungos reais e variando-se sua coloração. Os modelos foram posteriormente expostos em ambiente natural, permitindo avaliar a frequência de aproximação e visitação por insetos e outros artrópodes potencialmente associados à dispersão de esporos.

Inicialmente, foi testada a hipótese de que a variação na coloração dos basidiomas de Clathrus atua como uma característica visual acessória, podendo contribuir para a localização dos corpos de frutificação por potenciais dispersores, de modo que modelos com diferentes padrões de coloração apresentarão diferenças na frequência de aproximação e visitação desses organismos. Caso essa hipótese seja corroborada, diferenças na frequência de interação entre os modelos indicarão que a coloração pode atuar como uma característica visual capaz de influenciar a atração de potenciais dispersores.

Metodologia

Foram confeccionados três modelos tridimensionais baseados na estrutura clatróide do gênero Clathrus, caracterizada por uma gaiola oca com braços fundidos (Figura 1). A estrutura interna de suporte foi feita com palitos de madeira unidos por cola quente em configuração pentagonal e hexagonal, posteriormente revestida com massa de biscuit. Os modelos foram produzidos nas cores amarela (pigmentada com tinta PVA amarelo bebê), vermelha (tinta PVA vermelho fogo) e branca (massa natural revestida com tinta PVA branca após a secagem). A sustentação dos elementos deu-se por fios de arame galvanizado (0,5 mm) e, após a secagem, aplicou-se uma camada de verniz para aumento da durabilidade. Os três modelos resultantes apresentavam conformação estrutural semelhante, diferindo em cor e tamanho.

O estudo foi conduzido no fragmento urbano de Mata Atlântica e restinga da Matinha dos Saguis, no campus central da UFRN, em Natal/RN. Os modelos experimentais foram posicionados em três condições ambientais distintas da área de estudo: clareira, borda de mata e interior de mata. Em cada local, os três modelos correspondentes aos diferentes tratamentos de coloração foram dispostos formando um triângulo, mantendo-se uma distância aproximada de 30 cm entre os modelos (Figura 2), a disposição dos modelos foi definida de modo a facilitar a observação. Essa disposição foi padronizada entre os ambientes, de modo a manter condições espaciais semelhantes para os diferentes tratamentos. Após o posicionamento dos modelos, foi realizada a mensuração da intensidade luminosa incidente em cada ponto experimental, utilizando um luxímetro digital Minipa, modelo MLM-1020. O equipamento possui um sensor de luz responsável por detectar a radiação luminosa incidente e expressar a intensidade de iluminação em lux (lx), unidade correspondente à iluminância. A mensuração da luminosidade nos pontos de exposição permitiu caracterizar a média das condições de iluminação de cada ambiente e posteriormente avaliar sua possível relação com a frequência de aproximação e visitação dos artrópodes aos modelos.

Após a instalação, os modelos permaneceram expostos em campo por aproximadamente seis horas contínuas em cada dia de amostragem, durante quatro dias de observação, sendo distribuídos nas diferentes áreas previamente estabelecidas para o estudo. As observações foram realizadas durante o período da manhã, com início entre as 6h00 e término próximo às 12h00, período caracterizado pela presença de luz natural e, portanto, pela disponibilidade de informação visual para os potenciais visitantes. A definição desse intervalo também buscou reproduzir o período de disponibilidade natural dos corpos frutíferos de Clathrus, que apresentam curta permanência no ambiente e se desintegram após a maturação, não permanecendo disponíveis durante todo o período diurno. Dessa forma, foram priorizadas as interações ocorridas durante o período em que os modelos poderiam ser visualmente percebidos pelos organismos, evitando-se a inclusão de possíveis visitas ocorridas em condições de baixa ou ausência de luminosidade. Durante esse período, foram registrados os artrópodes e outros organismos que se aproximaram ou interagiram com os modelos experimentais.

As observações foram realizadas de forma ativa, por meio de dois procedimentos complementares: observação direta, sem o auxílio de câmera, e observação com auxílio de câmera. Na observação direta, os organismos que se aproximavam ou interagiam com os modelos eram acompanhados visualmente e registrados pelo observador. Nas observações com auxílio de câmera, os eventos de aproximação e interação eram registrados por meio de equipamento audiovisual, permitindo o acompanhamento dos organismos à distância e reduzindo possíveis interferências decorrentes da presença do observador. Em cada dia de amostragem, foram realizadas aproximadamente 120 minutos de observação com auxílio de câmera e 240 minutos de observação direta, totalizando 360 minutos de observação por dia. Durante as observações com auxílio de câmera, o observador permaneceu a aproximadamente 8 m de distância dos modelos, utilizando uma câmera Canon EOS Rebel SL3, equipada com sensor de 24,1 megapixels e capacidade de gravação de vídeos em resolução 4K,para realizar o registro das aproximações e interações dos visitantes.

Nas observações realizadas sem o auxílio de câmera, o observador permaneceu inicialmente a aproximadamente 4,5 m dos modelos, realizando o acompanhamento visual direto das aproximações e interações. Quando necessário para possibilitar a

visualização ou identificação dos visitantes, a distância foi reduzida, podendo chegar a aproximadamente 2 m dos modelos. Durante o período de observação, foram registrados os eventos de aproximação e visitação aos modelos, considerando-se, sempre que possível, a coloração do modelo visitado, o ambiente em que este estava inserido, o horário da ocorrência e a identificação do visitante até o menor nível taxonômico possível. Os dados obtidos foram posteriormente utilizados para comparar a frequência de visitação entre os diferentes tratamentos de coloração e entre os três ambientes experimentais.

Resultados e Discussões

Durante o período de observações dos modelos experimentais de Clathrus, foram registradas 58 interações correspondentes a diferentes grupos de artrópodes nas três condições ambientais avaliadas: interior da mata em condições de semi-clareira, borda da mata e interior da mata sob sombra total. As condições de luminosidade apresentaram variação entre os ambientes, com registros de 376 lux na semi-clareira, aproximadamente 2.000 lux na borda da mata e 54 lux no ambiente de sombra total.

Foram observadas interações com representantes de diferentes grupos de artrópodes, incluindo Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera, Isopoda e outros artrópodes, representado por aracnídeos que não foi possível identificar a ordem. A frequência de visitantes variou entre as diferentes colorações dos modelos e entre ambientes avaliados (Tabela 1).

No interior da mata, em condição de semi-clareira, foram registrados 27 visitantes. O modelo branco apresentou cinco registros, correspondendo a 18,5% das visitas nesse ambiente, enquanto os modelos amarelo e vermelho apresentaram 13 (48,1%) e nove (33,3%) registros, respectivamente. Assim, nessa condição ambiental, a maior frequência de visitantes foi observada no modelo amarelo. Na borda da mata, foram registrados 19 visitantes. O modelo branco apresentou dois registros (10,5%), o amarelo oito (42,1%) e o vermelho nove (47,4%), sendo o modelo vermelho aquele com maior frequência de visitantes, seguido pelos modelos amarelo e branco. No interior da mata, sob sombra total, foram registrados 12 visitantes. O modelo branco apresentou dois registros (16,7%), o amarelo nove (75,0%) e o vermelho um (8,3%). Nessa condição, o modelo amarelo concentrou a maior frequência de visitantes.

Considerando os três ambientes avaliados, observou-se variação na frequência de visitas entre as colorações dos modelos. O modelo amarelo apresentou maior número de registros nas condições de semi-clareira e sombra total, enquanto o modelo vermelho apresentou maior frequência de visitantes na borda da mata. O modelo branco apresentou as menores frequências de visitação nas três condições ambientais.

Conclusão

Os resultados indicam que a coloração dos modelos experimentais pode atuar como um sinal visual complementar ao odor na atração de visitantes aos corpos de frutificação de Clathrus. As diferenças observadas na frequência de aproximações e interações sugerem que o estímulo visual participa da localização do fungo, embora as respostas dos organismos não tenham sido uniformes e tenham sofrido influência de fatores como luminosidade, ambiente e condições de observação.

Variáveis ambientais e climáticas exerceram papel relevante no experimento. A maior frequência de visitações registrada no interior da mata (condição de semi-clareira) coincidiu com um dia chuvoso, o que pode ter alterado a atividade dos artrópodes. Assim, as comparações entre as áreas exigem cautela devido à falta de padronização climática entre os períodos amostrais. Além disso, o fato de a área de estudo (Matinha dos Saguis) estar inserida em um contexto urbano com sinais de eutrofização pode ter modificado a composição e a disponibilidade da fauna local, justificando a realização de estudos futuros em ambientes com diferentes níveis de conservação.

O critério de amostragem também influenciou os dados finais. Apenas contatos diretos (pousar, permanecer ou caminhar) foram contabilizados como interações, excluindo comportamentos de sobrevoo frequentes de insetos como borboletas e mosquitos. Essa abordagem pode ter subestimado as respostas comportamentais prévias ao contato físico.

Para estudos futuros, deve-se levar em consideração o aprimoramento da caracterização visual dos modelos. Embora a avaliação da coloração tenha sido realizada experimentalmente, não foi possível realizar uma caracterização mais precisa das propriedades visuais das espécies de Clathrus utilizadas como referência, devido à ausência de coletas dos espécimes durante o período de estudo. Essa limitação pode estar relacionada à possível sazonalidade de ocorrência desses fungos, uma vez que a disponibilidade dos corpos de frutificação pode variar de acordo com as condições ambientais e o período do ano. Dessa forma, estudos futuros que contemplem o acompanhamento sazonal e a coleta de espécimes poderão contribuir para uma caracterização mais precisa das cores e de suas propriedades visuais, fornecendo dados mais robustos para a construção dos modelos e para posteriores análises de percepção visual pelos potenciais dispersores.

Destaca-se ainda que, os resultados deste estudo constituem uma etapa inicial na investigação da possível participação da coloração na atração de potenciais dispersores de Clathrus. Embora não seja possível estabelecer uma relação causal entre a coloração e a atração dos visitantes a partir dos dados obtidos, os resultados reforçam a importância de investigar a comunicação visual em conjunto com outros sinais, especialmente o odor, considerando também as condições climáticas, a luminosidade, as características do ambiente e as diferentes respostas comportamentais dos visitantes.

Referências

CABRAL, Louise Cavalcante de Souza. Estimativa do valor de conservação de um fragmento de Mata Atlântica (Natal/RN). 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

Halbwachs, H.; Simmel, J.; Bässler, C. 2016. Tales and mysteries of fungal fruiting: how morphological and physiological traits affect a pileate lifestyle. Fungal Biology Reviews 30: 36-61.

He, MQ., Cao, B., Liu, F. et al. Filogenômica, tempos de divergência e notas sobre ordens em Basidiomycota. Fungal Diversity 126 , 127–406 (2024). https://doi.org/10.1007/s13225-024-00535-w

Hosaka K, Uno K (2012) A preliminary survey on larval diversity in mushroom fruitbodies. Bull Natl Museum Nat Sci Ser B 38(3):77–85Return

LIN, Lan; XU, Jianping. Fungal Pigments and Their Roles Associated with Human Health. Journal of Fungi, Basileia, v. 6, n. 4, p. 280, 2020. DOI: 10.3390/jof6040280.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, A. S.; SINGH, A.; PANDEY, G. C.; SRIVASTAVA, G. An overview of symbiotic and pathogenic interactions at the fungi-plant interface under environmental constraints. Frontiers in Fungal Biology, v. 5, 2024. DOI: 10.3389/ffunb.2024.1363460.

Niskanen T, Lücking R, Dahlberg A, Gaya E, Suz LM, Mikryukov V, Liimatainen K, Druzhinina I, Westrip JR, Mueller GM, Martins-Cunha K, Kirk P, Tedersoo L, Antonelli A (2023) Pushing the frontiers of biodiversity research: unveiling the global diversity, distribution, and conservation of fungi. Annu Rev Environ Resour 48:149–176.https://doi.org/10.1146/annurev-environ-112621-090937

RENOULT, J. P.; KELBER, A.; SCHAEFER, H. M. Colour spaces in ecology and evolutionary biology. Biological Reviews, v. 92, p. 292–315, 2017. DOI: 10.1111/brv.12230.

RIBEIRO, Mateus Santana; CABRAL, Tiara Sousa; MELANDA, Gislaine Cristina Souza; OLIVEIRA, Renan de Lima; BASEIA, Iuri Goulart; SILVA, Bianca Denise Barbosa da. Phallales fungi (Phallomycetidae, Basidiomycota) in Brazil: first checklist and key specific for the country. Journal of the Torrey Botanical Society, v. 149, n. 3, p. 230–252, 2022. DOI: 10.3159/TORREY-D-21-00043.1.

TRESEDER, K. K.; LENNON, J. T. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 79, n. 2, p. 243–262, 2015. DOI: 10.1128/MMBR.00001-15.

VAN DER KOOI, C. J.; STAVENGA, D. G.; ARIKAWA, K.; BELUŠIČ, G.; KELBER, A. Evolution of insect color vision: from spectral sensitivity to visual ecology. Annual Review of Entomology, v. 66, p. 435–461, 2021. DOI: 10.1146/annurev-ento-061720-071644.

Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Mikhailov, K.V. et al. Classes and phyla of the kingdom Fungi. Fungal Diversity 128, 1–165 (2024).https://doi.org/10.1007/s13225-024-00540-z

Anexos



Modelos tridimensionais inspirados na morfologia dos corpos frutíferos do gênero Clathrus, confeccionados em massa de biscuit e nas cores branca, vermelha e amarela.



Número de visitantes registrados nos modelos experimentais de Clathrus de diferentes colorações (branco, amarelo e vermelho) em três condições ambientais, considerando a média da luminosidade e os grupos de artrópodes observados na área de estudo.

CÓDIGO: SB1238

AUTOR: MARCIA VITORIA FERNANDES FERREIRA

COAUTOR: RONALD WICTOR AVELINO DE LIMA

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

COAUTOR: MATEUS AMARAL DA SILVA

COAUTOR: GABRIELLY ALVES DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Diversidade e associações ecológicas de Stratiomyidae (Diptera) no Rio Grande do Norte

Resumo

A família Stratiomyidae reúne 2.651 espécies em 375 gêneros, mas permanece pouco conhecida no Rio Grande do Norte. Este estudo objetivou inventariar a família e caracterizar suas interações ecológicas no estado. A metodologia integrou revisão sistemática, bases de biodiversidade, análise do acervo do Laboratório de Moscas-das-Frutas (DBG/UFRN), coleta de frutos em unidades de conservação de Natal e armadilhas de interceptação de voo tipo janela. A revisão confirmou os registros do Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil, e as bases acrescentaram *Hoplitimyia subalba* (Walker, 1854) e *Sargus fasciatus* Fabricius, 1805. As coletas e o acervo elevaram o inventário para ao menos nove espécies e 650 exemplares, com predomínio de *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1805) [n=499] e *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) [n=141]. Também foram obtidos *Sargus brasiliensis* Wiedemann, 1830 e *Chrysochlorina* sp. nov. Ptecticus testaceus desenvolveu-se em nove espécies vegetais, oito delas substratos potencialmente inéditos. *Hermetia illucens* emergiu de *Mangifera indica* L., *Syagrus cearensis* Noblick e *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.) Hauenschild, sendo os dois últimos novos substratos naturais. Sargus brasiliensis emergiu de *Manihot dichotoma* Ule e *S. joazeiro*, fornecendo os primeiros dados sobre seus substratos larvais. O estudo amplia o inventário, revela associações inéditas e evidencia a participação dessas moscas na decomposição e ciclagem de nutrientes.

Palavras-chave: Sarginae; inventário faunístico; parasitoidismo.

TITLE: Diversity and Ecological Associations of Stratiomyidae (Diptera) in Rio Grande do Norte, Brazil

Abstract

The family Stratiomyidae comprises 2,651 species in 375 genera but remains poorly known in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. This study aimed to survey the family and characterize its ecological interactions in the state. The methodology combined a systematic review, biodiversity databases, analysis of the collection of the Fruit Fly Laboratory (DBG/UFRN), fruit sampling in protected areas of Natal, and window flight-interception traps. The review confirmed records from the Taxonomic Catalog of the Brazilian Fauna, while the databases added *Hoplitimyia subalba* (Walker, 1854) and *Sargus fasciatus* Fabricius, 1805. Field sampling and collection analysis increased the state inventory to at least nine species and 650 specimens, predominantly *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1805) [n=499] and *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) [n=141]. *Sargus brasiliensis* Wiedemann, 1830 and *Chrysochlorina* sp. nov. were also obtained. Ptecticus testaceus developed in nine plant species, eight of which are potentially novel substrates. *Hermetia illucens* emerged from *Mangifera indica* L., *Syagrus cearensis* Noblick, and *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.) Hauenschild, with the latter two representing new natural substrates. *Sargus brasiliensis* emerged from *Manihot dichotoma* Ule and *S. joazeiro*, providing the first data on its larval substrates. This study expands the state inventory, reveals novel associations, and highlights the role of these flies in decomposition and nutrient cycling.

Keywords: Sarginae; faunistic inventory; parasitoidism.

Introdução

A família Stratiomyidae, conhecida como moscas-soldado, apresenta distribuição mundial e elevada diversidade morfológica e ecológica. Seus adultos variam amplamente em tamanho, coloração e forma corporal, incluindo espécies metálicas ou semelhantes a himenópteros (Woodley, 2001; Kovac; Rozkošný, 2004). O catálogo mundial da família reconheceu 2.651 espécies válidas distribuídas em 375 gêneros, das quais 987 ocorriam na Região Neotropical, com base na literatura taxonômica disponível até 1º de abril de 2000 (Woodley, 2001). Compilações posteriores elevaram esses números para mais de 2.800 espécies, aproximadamente 1.000 delas neotropicais (Fachin; Assis-Pujol, 2016). No Brasil, são conhecidas cerca de 340 espécies, o que posiciona o país entre aqueles com maior riqueza registrada para a família (Fachin; Assis-Pujol, 2016; Fachin et al., 2023).

Os estágios larvais de Stratiomyidae podem ocupar ambientes terrestres, aquáticos ou semiaquáticos. As larvas terrestres desenvolvem-se em matéria vegetal ou animal em decomposição, madeira morta e excrementos, enquanto as aquáticas podem ocorrer em lagoas, margens de cursos d'água, áreas pantanosas, superfícies úmidas e fitotelmos (Kovac; Rozkošný, 2004). Em Sarginae, larvas de *Ptecticus* Loew, 1855 são saprófagas e podem alimentar-se principalmente dos microrganismos presentes nos materiais vegetais em decomposição que utilizam como substrato (Rozkošný; Kovac, 1998). Para *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1805), já foi documentado o desenvolvimento larval na polpa em decomposição de Couroupita guianensis Aubl. (Pujol-Luz; Leite, 2001). A utilização desses recursos evidencia a importância da família para estudos sobre decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (Kovac; Rozkošný, 2004; Pujol-Luz; Leite, 2001).

Apesar da riqueza registrada no Brasil, o número real de espécies, seus limites de distribuição e diferentes aspectos de sua biologia e sazonalidade permanecem insuficientemente conhecidos (Fachin et al., 2023). Levantamentos padronizados têm revelado elevada riqueza local e novos registros geográficos, enquanto a integração entre literatura e coleções entomológicas tem ampliado expressivamente as faunas anteriormente conhecidas (Fachin et al., 2023; Torres-Toro; Grisales; Wolff, 2022). Esses resultados demonstram que revisões bibliográficas, estudos de acervos científicos e coletas de campo são abordagens complementares e necessárias para reduzir lacunas taxonômicas, biogeográficas e ecológicas.

No Rio Grande do Norte, o conhecimento histórico sobre Stratiomyidae inclui registros publicados desde a primeira metade do século XX. Entre eles está a descrição de Hoplistes pleuralis James, 1949, baseada em material coletado em Natal em 1943, juntamente com registros de outras espécies da família para a mesma localidade (James, 1949). Posteriormente, a posição taxonômica de H. pleuralis foi considerada incerta e dependente do reexame do material-tipo (Pimentel; Pujol-Luz, 2001). Contudo, a existência de registros históricos pontuais não permite, isoladamente, compreender a riqueza, a distribuição e as associações ecológicas da família no estado. Torna-se necessário revisar criticamente as fontes disponíveis e complementar essas informações por meio do estudo de acervos e de novas amostragens, possibilitando reunir ocorrências antigas e atuais em uma síntese regional.

Diante dessa lacuna, a pesquisa justifica-se pela necessidade de consolidar e atualizar o conhecimento sobre Stratiomyidae no Rio Grande do Norte, produzindo informações que contribuam para o estudo de sua diversidade, distribuição e ecologia. Assim, este trabalho teve como objetivo inventariar os Stratiomyidae registrados no estado e caracterizar suas interações ecológicas.

Metodologia

Área de estudo e locais de coleta

O estudo abrangeu localidades do Rio Grande do Norte na Mata Atlântica e na Caatinga. Na Mata Atlântica, foram incluídos o município de Espírito Santo, a localidade de Alcaçuz e, em Natal, o Parque Estadual Dunas do Natal Jornalista Luiz Maria Alves e o Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte. Na Caatinga, foram incluídos Assú e Lagoa Nova. As coletas de campo ocorreram nas áreas de Mata Atlântica: no Parque das Dunas, de 20 de fevereiro de 2025 até 22 de agosto de 2026; no Parque da Cidade, de 7 de agosto de 2025 a 23 de junho de 2026; e em Espírito Santo, de 18 de agosto de 2025 a 22 de junho de 2026.

Coleta e processamento dos frutos

Foram recolhidos exclusivamente frutos encontrados sobre o solo, priorizando-se aqueles em estágios mais avançados de maturação ou decomposição, devido à maior possibilidade de associação com larvas de Stratiomyidae. Essa escolha considerou registros de larvas de *Ptecticus* associadas a frutos caídos e matéria vegetal em decomposição (Cordero-Jenkins; Jirón; Lezama, 1990; Pujol-Luz; Leite, 2001). Cada amostra foi individualizada por espécie vegetal, localidade e data. Coordenadas, altitude, data e horário foram registrados com o aplicativo Timestamp Camera, versão 1.252.

Os frutos foram acondicionados em sacolas plásticas identificadas e transportados ao LABMOSCA/DBG/UFRN. No laboratório, foram transferidos para bandejas identificadas, mantidos sobre vermiculita e cobertos com tecido do tipo voil. A vermiculita foi peneirada semanalmente durante três semanas, segundo protocolo empregado para obtenção de moscas frugívoras e outros insetos associados a frutos (Nascimento et al., 2000). Larvas e pupas foram transferidas para recipientes identificados e mantidos em caixas acrílicas até a emergência. Os adultos foram etiquetados e preservados em álcool 70%, em frascos de vidro.

Coleta com armadilhas de interceptação de voo

Foram utilizadas armadilhas de interceptação de voo do tipo janela no Parque das Dunas, área de Mata Atlântica, nas coordenadas 5,8118° S e 35,1921° O, a 57 m de altitude, entre 20 de fevereiro de 2025 e o presente. Cada armadilha possuía uma lâmina de plástico transparente disposta verticalmente, fixada na parte superior a uma peça de madeira suspensa por barbantes e, na inferior, a um segmento de tubo de PVC com água e detergente. Ao colidirem com a lâmina, os insetos caíam no recipiente, no qual o detergente reduzia a tensão superficial da água e dificultava sua fuga. O material foi recolhido e transportado ao laboratório.

Análise do acervo entomológico

Foram examinados espécimes de Stratiomyidae do acervo entomológico do Laboratório de Moscas-das-Frutas do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LABMOSCA/DBG/UFRN). Na Caatinga, o material procedeu de Assú, coletado entre junho de 2001 e maio de 2011, e de Lagoa Nova, entre setembro de 2014 e agosto de 2019. Na Mata Atlântica, foram examinados espécimes de Alcaçuz, coletados entre Julho de 1999 e Julho de 2020. As informações das etiquetas e planilhas, como identificação, localidade, coordenadas, data, método de coleta, coletor, planta hospedeira ou substrato, foram transcritas para o Google Planilhas.

Triagem e identificação taxonômica

O material proveniente das coletas de frutos, das armadilhas e do acervo foi triado sob estereomicroscópio Motic SMZ-168. Os Stratiomyidae foram separados dos demais insetos, preservados, em sua maioria, em álcool 70%, em frascos de vidro, e

posteriormente contados, sexados e organizados conforme a procedência e o método de obtenção.

A identificação foi realizada até o nível taxonômico mais preciso possível, com base em caracteres morfológicos externos, chaves, descrições e literatura especializada. Quando a identificação específica não foi possível, o material permaneceu em nível de gênero ou família. Os dados foram organizados no Google Planilhas, incluindo táxon, autoria, sexo, número de exemplares, estágio de desenvolvimento, localidade, coordenadas, altitude, data, método de coleta, coletor, planta hospedeira ou substrato e fonte do registro.

Revisão sistemática e bases de biodiversidade

A revisão foi conduzida nas bases Web of Science, SciELO, Portal de Periódicos da CAPES, Scopus e Google Scholar, combinando “Stratiomyidae”, “Stratiomyid*”, “Soldier-fly” e “Mosca-soldado” com “Rio Grande do Norte”, “RN”, “Potiguar”, “Nordeste”, “Northeast”, “Caatinga”, “Semiarid*”, “Atlantic Forest”, “Mata Atlântica” e “Brazil”. As expressões foram adaptadas à sintaxe de cada base. As referências foram organizadas no Zotero, e os resultados e dados extraídos, no Google Planilhas. Após a remoção de duplicatas, foram avaliados títulos, resumos e, quando necessário, textos completos.

Foram incluídos estudos com registros de Stratiomyidae para o Rio Grande do Norte, mesmo em nível de família ou sem localidade específica, e excluídos aqueles sem registros para o estado ou sem relação com a área de estudo. Também foi aplicado o método de backward snowballing, mediante consulta às referências dos trabalhos selecionados. De cada documento foram extraídos, quando disponíveis, táxon, localidade, coordenadas, data, método de coleta, número e sexo dos exemplares, estágio de desenvolvimento, planta hospedeira ou substrato e instituição depositária.

A busca foi complementada por consultas ao SpeciesLink, ao Global Biodiversity Information Facility (GBIF) e ao Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. No GBIF, foram considerados dados integrados do iNaturalist e do Barcode of Life Data System (BOLD). As consultas empregaram Stratiomyidae como termo taxonômico e o Rio Grande do Norte como delimitação geográfica. Cada registro foi examinado quanto à identificação, localidade, coordenadas, data, base, instituição, número de catálogo, coletor e determinador. Duplicatas foram verificadas pela comparação entre identificador, táxon, localidade, coordenadas e data.

Resultados e Discussões

Revisão bibliográfica e registros prévios

As buscas nas bases bibliográficas recuperaram 783 registros: 51 na Web of Science, 37 na SciELO, 48 no Portal de Periódicos da CAPES, 56 na Scopus, 163 no Google Acadêmico e 428 por meio de backward snowballing. Após a remoção das duplicatas, permaneceram 665 registros para avaliação, dos quais seis atenderam aos critérios de inclusão. A Web of Science contribuiu com um trabalho, o Google Acadêmico com três e o backward snowballing com dois. Nenhum dos resultados provenientes da SciELO, do Portal de Periódicos da CAPES ou da Scopus foi incluído.

Dois dos trabalhos selecionados registraram Stratiomyidae apenas no nível de família. Um deles incluiu o grupo em uma lista de macroinvertebrados aquáticos do Rio Grande do Norte, enquanto o outro mencionou sua ocorrência em um Plano de Monitoramento Ambiental do IDEMA. Esses documentos não forneceram identificação específica, localidade precisa ou informações sobre o método de coleta.

A literatura taxonômica e o Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil indicaram sete espécies previamente registradas no Rio Grande do Norte: *Hoplistes pleuralis* James, 1949, *Microchrysa bicolor*, *Ptecticus testaceus* (Fabricius, 1805), *Sargus thoracicus* Macquart, 1834, *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758), *Cyphomyia lanuginosa* Gerstaecker, 1857 e *Cyphomyia gracilicornis* Gerstaecker, 1857. A maior parte dos registros históricos apresentou Natal como localidade. Para *H. pleuralis*, foram recuperadas informações referentes ao holótipo, ao alótipo e a dez parátipos coletados por F. M. Snyder entre 5 e 24 de fevereiro de 1943 (James, 1949). Também foram documentadas, em Natal, duas fêmeas de *M. bicolor*, uma fêmea de *P. testaceus*, uma fêmea de *S. thoracicus*, um macho de *H. illucens* e dois machos e duas fêmeas de *C. lanuginosa*. Para C. gracilicornis, a literatura informou apenas a ocorrência no Rio Grande do Norte, sem especificar uma localidade no estado.

O SpeciesLink não apresentou registros de Stratiomyidae para o Rio Grande do Norte. As demais bases consultadas acrescentaram *Hoplitimyia subalba* (Walker, 1854) e *Sargus fasciatus* Fabricius, 1805 à relação estadual. Também foram recuperadas ocorrências de *H. illucens*, *P. testaceus* e *S. thoracicus*, além de registros identificados somente como Stratiomyidae ou *Ptecticus*. Os dados moleculares incluíram o BIN BOLD:AAD0622, atribuído a *H. illucens*, e os agrupamentos BOLD:AGJ2958 e BOLD:AGJ2768, identificados no nível de família.

Síntese das ocorrências no Rio Grande do Norte

A integração da literatura, do Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e das bases de biodiversidade permitiu reconhecer nove espécies previamente registradas no Rio Grande do Norte. O material proveniente das coletas e do acervo acrescentou *Sargus brasiliensis* Wiedemann, 1830 e *Chrysochlorina* sp., elevando para 11 o número de táxons identificados em nível específico ou de morfoespécie no inventário integrado.

Composição do material examinado

Foram examinados 650 exemplares de Stratiomyidae, dos quais 616 foram provenientes das coletas e 34 do acervo. O material foi distribuído entre quatro táxons: Ptecticus testaceus, com 499 indivíduos; *Hermetia illucens*, com 141; *Sargus brasiliensis*, com oito; e *Chrysochlorina* sp., com dois. Em relação ao total examinado, *P. testaceus* correspondeu a 76,8%, *H. illucens* a 21,7%, *S. brasiliensis* a 1,2% e *Chrysochlorina* sp. a 0,3%.

Foram identificadas 314 fêmeas e 336 machos. *Ptecticus testaceus* apresentou 246 fêmeas e 253 machos; *H. illucens*, 60 fêmeas e 81 machos; *S. brasiliensis*, sete fêmeas e um macho; e *Chrysochlorina* sp., uma fêmea e um macho. Nas coletas foram obtidas 297 fêmeas e 319 machos, totalizando 616 indivíduos. O acervo reuniu 17 fêmeas e 17 machos, totalizando 34 exemplares. Destes, 32 indivíduos de P. testaceus foram provenientes de Psidium guajava em Assú, um da mesma planta em Alcaçuz, Nísia Floresta, e um foi coletado manualmente em Lagoa Nova, sem planta associada determinada. A distribuição desse material por origem, planta associada, espécie, subfamília e sexo é apresentada na Tabela 1.

Espécies, métodos de obtenção e substratos associados

Dos 499 exemplares de *P. testaceus*, 465 foram provenientes das coletas e 34 do acervo. Considerando o método de obtenção, 472 adultos emergiram de frutos coletados no solo, 26 foram capturados em armadilhas de interceptação de voo e um exemplar do acervo foi obtido por coleta manual.

A espécie emergiu de frutos de nove espécies vegetais: *Mangifera indica* L., *Psidium guajava* L., *Passiflora edulis* Sims, *Homalolepis bahiensis* (Moric.) Devecchi & Pirani, *Syagrus cearensis* Noblick, *Mespilodaphne fasciculata* (Nees) Meisn., *Eugenia azeda* Sobral, *Lucuma grandiflora* A.DC. *e Agonandra brasiliensis* Benth. & Hook.f. O maior número de indivíduos foi obtido em *M. indica*, com 315 exemplares, seguido de *S. cearensis*, com 56; *A. brasiliensis*, com 34; *P. guajava*, com 33; *M. fasciculata*, com 12; *P. edulis*, com dez; *H. bahiensis*, com sete; *L. grandiflora*, com quatro; e *E. azeda*, com um. Os exemplares obtidos em *M. indica* corresponderam a aproximadamente 63,1% de todos os indivíduos de *P. testaceus* e a 66,7% daqueles emergidos de frutos.

Todos os 141 exemplares de *H. illucens* foram provenientes das coletas. Destes, 110 emergiram de frutos e 31 foram capturados em armadilhas de interceptação de voo. Entre os indivíduos provenientes de frutos, 80 emergiram de *S. cearensis*, 29 de *M. indica* e um de *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.) Hauenschild. Os exemplares associados a *S. cearensis* corresponderam a 72,7% dos indivíduos da espécie emergidos de frutos.

Os oito exemplares de *S. brasiliensis* emergiram de frutos coletados no Parque Estadual das Dunas. Sete indivíduos foram obtidos em *Manihot dichotoma Ule* e um em *S. joazeiro*. Os sete exemplares associados a *M. dichotoma* foram constituídos por seis fêmeas e um macho, enquanto o exemplar obtido em S. joazeiro era uma fêmea.

Os dois exemplares de *Chrysochlorina* sp., um macho e uma fêmea, foram capturados no Parque Estadual das Dunas por meio de armadilha de interceptação de voo. Nenhum indivíduo desse táxon foi obtido nas coletas de frutos.

Durante a manutenção do material proveniente das coletas de frutos, também foram obtidos exemplares de *Lixophaga* Townsend, 1908 (Diptera: Tachinidae), que emergiram de pupários de *Ptecticus testaceus*. Os parasitoides foram identificados até o nível de gênero.

Distribuição geográfica dos registros

A distribuição das ocorrências obtidas na literatura, nas bases de biodiversidade, nas coletas e no acervo é apresentada na Figura 1. O mapa reúne 11 táxons e evidencia maior concentração de registros no litoral oriental, principalmente em Natal e em seu entorno. O detalhe da capital reúne registros históricos, dados das bases e pontos provenientes do Parque Estadual das Dunas e do Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte. Fora dessa área, existem ocorrências isoladas no interior e em outros trechos do litoral. O registro de *C. gracilicornis* foi considerado na riqueza estadual, mas, por não possuir localidade específica, não permite interpretação espacial em escala municipal.

Discussão

Lacunas do conhecimento e representatividade dos registros

A seleção de apenas seis trabalhos entre 665 registros avaliados, proporção inferior a 1%, evidencia que as informações sobre Stratiomyidae no Rio Grande do Norte permanecem escassas e dispersas. A recuperação de parte dos trabalhos pelo Google Acadêmico e pelo rastreamento de referências mostra que registros relevantes podem permanecer fora das principais bases indexadoras. A escassez observada no estado acompanha uma lacuna mais ampla: mesmo no Brasil, cuja fauna de Stratiomyidae está entre as mais ricas conhecidas, ainda são insuficientemente conhecidos o número real de espécies, seus limites de distribuição e sua sazonalidade (Fachin et al., 2023).

A integração de literatura, bases de biodiversidade, acervo e novas coletas foi fundamental para reduzir essa fragmentação. Estratégia semelhante mostrou-se eficiente na Colômbia, onde a análise conjunta de literatura e coleções biológicas ampliou significativamente o conhecimento sobre os gêneros de Stratiomyidae registrados no país (Torres-Toro; Grisales; Wolff, 2022). No presente estudo, essa abordagem permitiu reunir registros históricos e atuais e reconhecer 11 táxons no inventário integrado do Rio Grande do Norte. Esse número deve ser entendido como uma estimativa inicial da fauna estadual. Em Goiás, por exemplo, Machado e Fachin (2025) obtiveram 855 exemplares representando 63 espécies ou morfoespécies com armadilhas Malaise, das quais 59 constituíram novos registros estaduais, elevando expressivamente a fauna conhecida.

Os registros disponíveis também são espacialmente desiguais. A concentração histórica em Natal coincide com a presença de instituições de pesquisa, registros antigos e maior esforço de coleta, não devendo ser interpretada como evidência direta de maior riqueza no município. A Caatinga permanece particularmente subamostrada, enquanto ambientes

aquáticos, madeira em decomposição, serapilheira, brejos de altitude e zonas de transição praticamente não foram investigados. O registro de C. gracilicornis apenas para o estado, sem localidade específica, exemplifica outra limitação: ele contribui para a lista estadual, mas não permite inferências sobre sua distribuição municipal.

Composição e associações ecológicas

Ptecticus testaceus e *H. illucens* corresponderam conjuntamente a 98,5% dos exemplares examinados. Essa dominância deve ser interpretada considerando o desenho amostral, pois a coleta prioritária de frutos em decomposição favorece espécies cujas larvas utilizam matéria orgânica vegetal. A proximidade entre 314 fêmeas e 336 machos também não permite inferir razão sexual equilibrada, pois o material reúne localidades, períodos e métodos distintos sem delineamento específico para testar essa proporção. Inventários baseados em armadilhas para adultos podem revelar uma composição muito mais ampla. Fachin et al. (2023), utilizando armadilhas Malaise em fragmentos de floresta estacional semidecidual de São Paulo, registraram 1.533 indivíduos distribuídos em 41 espécies, enquanto Machado e Fachin (2025) reconheceram 63 espécies ou morfoespécies em áreas protegidas do Cerrado goiano. Portanto, os quatro táxons presentes no material examinado não representam necessariamente a diversidade real do Rio Grande do Norte, mas principalmente a parcela da fauna acessível aos métodos utilizados.

A emergência de *P. testaceus* em nove espécies vegetais amplia substancialmente o conhecimento sobre seus substratos larvais. A associação com *M. indica* já havia sido registrada na Costa Rica, onde a espécie foi observada utilizando frutos de manga (Cordero-Jenkins; Jirón; Lezama, 1990). No Brasil, Pujol-Luz e Leite (2001) descreveram o último ínstar larval e o pupário de *P. testaceus* a partir de exemplares criados em polpa em decomposição de Couroupita guianensis. Os resultados do Rio Grande do Norte confirmam a utilização de manga em condições naturais e ampliam o conjunto de plantas associado à espécie.

Não foram encontrados, na literatura consultada, registros anteriores de *P. testaceus* em *S. cearensis*, *A. brasiliensis*, *P. guajava, M. fasciculata, P. edulis, H. bahiensis, L. grandiflora* e *E. azeda*. Assim, essas oito associações são consideradas potencialmente inéditas. Os dados ampliam o conhecimento sobre a ecologia larval de *P. testaceus*, especialmente diante da escassez de informações sobre imaturos de Sarginae. Fachin, Amaral e Falaschi (2024) indicaram que os estágios imaturos eram conhecidos para apenas 29 espécies da subfamília, somente oito delas neotropicais.

A maior abundância de *P. testaceus* em *M. indica* não permite concluir preferência pela planta. A quantidade e o peso dos frutos, sua disponibilidade em campo, o estágio de decomposição e o esforço de coleta não foram padronizados entre espécies vegetais. Por isso, os resultados demonstram utilização dos substratos, mas não permitem comparar sua qualidade ou preferência larval.

Hermetia illucens apresentou padrão semelhante de associação com matéria orgânica vegetal. A capacidade de suas larvas de desenvolver-se em diferentes substratos de origem vegetal é bem documentada em condições experimentais, inclusive em dietas constituídas por frutas e hortaliças (Jucker et al., 2017). Não foram localizadas, na

literatura consultada, ocorrências anteriores de emergência natural de *H. illucens* em *S. cearensis* e *S. joazeiro*, razão pela qual essas associações são consideradas potencialmente inéditas.

A emergência de *H. illucens* e *P. testaceus* em *M. indica* e *S. cearensis* demonstra ainda que um mesmo recurso em decomposição pode ser utilizado por diferentes Stratiomyidae. Esse compartilhamento não comprova competição direta, pois diferentes espécies podem utilizar fases ou microambientes distintos do processo de decomposição.

Novos registros e contribuições taxonômicas

Sargus brasiliensis representa um novo registro para o Rio Grande do Norte. Riccardi et al. (2022) indicaram a espécie para o Brasil nos estados do Rio de Janeiro e Roraima, além do Panamá, e Machado e Fachin (2025) registraram posteriormente sua ocorrência em Goiás. Nas fontes consultadas não foi localizado registro anterior para o Rio Grande do Norte, de modo que os exemplares do Parque Estadual das Dunas ampliam sua distribuição conhecida no país.

O resultado também acrescenta informações inéditas sobre sua biologia. Não foram encontrados dados anteriores sobre substratos larvais de *S. brasiliensis* na literatura consultada. A emergência de sete indivíduos em *M. dichotoma*, provenientes das amostras examinadas, e de um indivíduo em *S. joazeiro* fornece os primeiros substratos larvais conhecidos para a espécie no conjunto bibliográfico analisado. Esses registros, porém, abrem novas questões: ainda não é possível determinar se *S. brasiliensis* utiliza preferencialmente frutos, se existe associação recorrente com *M. dichotoma* ou Euphorbiaceae, ou se a espécie explora ampla variedade de matéria vegetal em decomposição. Novas coletas direcionadas aos mesmos substratos serão necessárias para avaliar a recorrência dessas associações.

A obtenção de um macho e uma fêmea de *Chrysochlorina* sp. também amplia o conhecimento taxonômico sobre a fauna estadual. A manutenção em nível de gênero é a decisão mais adequada até que os exemplares sejam comparados detalhadamente com as espécies descritas. A possibilidade de representar uma espécie ainda não descrita deve ser tratada como hipótese, não como resultado confirmado. O levantamento de Machado e Fachin (2025) também encontrou morfoespécies de *Chrysochlorina* não determinadas em Goiás, mostrando que ainda existem lacunas taxonômicas no gênero. O fato de os exemplares potiguares terem sido obtidos somente em armadilha de interceptação também mantém desconhecido seu substrato larval.

Interação parasitoide-hospedeiro

A emergência de *Lixophaga* a partir de pupários de *P. testaceus* acrescenta uma interação trófica relevante ao inventário. Gudin et al. (2022) descreveram *Lixophaga stratiophaga* a partir de pupários de *P. testaceus* coletados em frutos caídos de *Casearia combaymensis* na Amazônia, constituindo o primeiro registro conhecido de parasitoidismo de Stratiomyidae por Tachinidae. Assim, o resultado do Rio Grande do Norte não representa

a primeira associação entre esses gêneros, mas amplia geograficamente a ocorrência de parasitoidismo de *P. testaceus* por *Lixophaga* e constitui, nas fontes consultadas, o primeiro registro dessa interação para o estado.

A identificação apenas em nível de gênero impede determinar se os exemplares pertencem a *L. stratiophaga* ou a outra espécie. Caso a identificação específica confirme *L. stratiophaga*, haverá uma ampliação expressiva da distribuição conhecida dessa interação; caso se trate de outra espécie, poderá representar uma nova associação parasitoide-hospedeiro.

Complementaridade dos métodos de amostragem

As coletas de frutos, as armadilhas de interceptação de voo e a análise do acervo forneceram informações complementares. Os frutos permitiram reconhecer substratos larvais de *P. testaceus*, *H. illucens* e *S. brasiliensis* e revelar a interação com *Lixophaga*; as armadilhas foram o único método que registrou *Chrysochlorina* sp.; e o acervo ampliou a abrangência temporal e geográfica ao incluir Assú, Alcaçuz e Lagoa Nova.

Ao mesmo tempo, a heterogeneidade entre métodos, localidades e períodos limita comparações quantitativas. A armadilha de interceptação de voo foi utilizada apenas no Parque Estadual das Dunas, e o esforço de coleta de frutos não foi padronizado entre plantas ou localidades. Além disso, o acervo reúne materiais obtidos em períodos distintos das coletas recentes. Consequentemente, o estudo é adequado para documentar ocorrências e associações, mas não para comparar diretamente riqueza, abundância ou composição entre áreas e biomas.

Para aprimorar o inventário, futuras amostragens devem adotar esforço equivalente entre localidades e biomas, utilizar réplicas de armadilhas de interceptação ou Malaise e abranger um ciclo anual completo. Também é necessário incluir métodos voltados a larvas aquáticas, fitotelmos, madeira em decomposição, serapilheira e outros substratos. Os resultados de Fachin et al. (2023) e Machado e Fachin (2025) mostram que amostragens padronizadas de adultos podem revelar dezenas de espécies e numerosos novos registros mesmo em áreas com conhecimento prévio.

Padrão espacial, limitações e perspectivas

A concentração das ocorrências no litoral oriental, especialmente em Natal, reflete principalmente a concentração do esforço amostral, dos registros históricos e das instituições de pesquisa. O mapa deve, portanto, ser interpretado como representação da distribuição do conhecimento disponível, e não como uma estimativa uniforme da riqueza de Stratiomyidae no estado. A pequena representação da Caatinga constitui a principal lacuna geográfica do inventário.

Em conjunto, o estudo preenche parte da lacuna histórica sobre Stratiomyidae no Rio Grande do Norte ao integrar registros dispersos, elevar de nove para 11 o número de táxons reconhecidos no inventário, acrescentar *S. brasiliensis* e *Chrysochlorina* sp. ao

material conhecido para o estado e ampliar substancialmente as informações sobre substratos larvais. Foram reconhecidas oito associações vegetais potencialmente inéditas para *P. testaceus*, duas para *H. illucens* e os primeiros substratos larvais encontrados para *S. brasiliensis* na literatura consultada. A associação de *Lixophaga* com *P. testaceus* amplia para o Rio Grande do Norte uma interação anteriormente documentada na Amazônia. Ao mesmo tempo, os resultados abrem novas lacunas: permanecem desconhecidas a riqueza real da família no estado, a composição de grande parte da Caatinga, a sazonalidade das espécies, a identidade específica de *Chrysochlorina* sp. e *Lixophaga* sp. e a frequência e especificidade das associações larvais registradas. Assim, os dados constituem uma base para levantamentos futuros mais amplos e padronizados.

Conclusão

O inventário integrado de Stratiomyidae no Rio Grande do Norte reuniu registros históricos, bases de biodiversidade, material de acervo e novas coletas, permitindo reconhecer 11 táxons para o estado e ampliar o conhecimento sobre sua distribuição e ecologia. Entre as principais contribuições estão o novo registro estadual de Sargus brasiliensis, a obtenção de Chrysochlorina sp., possivelmente pertencente a uma espécie ainda não descrita, e a documentação de novas associações larvais com frutos em decomposição. Foram reconhecidos oito substratos potencialmente inéditos para *Ptecticus testaceus*, dois para *Hermetia illucens* e os primeiros substratos larvais encontrados para *S. brasiliensis* na literatura consultada. A emergência de *Lixophaga* a partir de pupários de *P. testaceus* também ampliou para o Rio Grande do Norte uma interação parasitoide-hospedeiro anteriormente registrada na Amazônia. A combinação entre coleta de frutos, armadilhas de interceptação de voo e análise do acervo demonstrou-se complementar, permitindo recuperar informações que dificilmente seriam obtidas por um único método.

Ao mesmo tempo, os resultados evidenciaram novas lacunas e oportunidades de investigação. A fauna de Stratiomyidae permanece pouco conhecida em grande parte do estado, especialmente na Caatinga, e ainda são necessários levantamentos padronizados que contemplem diferentes períodos do ano, localidades, biomas e ambientes larvais. A identidade específica de *Chrysochlorina* sp. e dos parasitoides de *Lixophaga* deverá ser investigada, assim como a recorrência, especificidade e importância ecológica das associações com plantas registradas neste estudo. A ampliação das amostragens para ambientes aquáticos, serapilheira, madeira e outros substratos em decomposição poderá revelar espécies não detectadas pelos métodos empregados. Dessa forma, o estudo estabelece uma base inicial para o conhecimento da família no Rio Grande do Norte e abre perspectivas para pesquisas taxonômicas, biogeográficas e ecológicas mais abrangentes.

Referências

FACHIN, Diego Aguilar; ASSIS-PUJOL, Cristiane Vieira de. Family Stratiomyidae. **Zootaxa**, v. 4122, n. 1, p. 312–341, 2016. DOI: 10.11646/zootaxa.4122.1.26.

FACHIN, Diego Aguilar; BUZATI, Vitória Rubra dos Santos; SILVA, Vera Cristina; ONODY, Helena Carolina. Soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) on semideciduous seasonal forest fragments, with a list of species for São Paulo State, Brazil, and two new records of species for the country. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 67, n. 2, e20230006, 2023. DOI: 10.1590/1806-9665-RBENT-2023-0006.

JAMES, Maurice T. Some African and Brazilian Stratiomyidae (Diptera). **American Museum Novitates**, New York, n. 1386, p. 1–7, 1949.

KOVAC, Damir; ROZKOŠNÝ, Rudolf. Insecta: Diptera, Stratiomyidae. In: YULE, Catherine M.; YONG, Hoi Sen (ed.). Freshwater invertebrates of the Malaysian Region. **Kuala Lumpur: Academy of Sciences** Malaysia, 2004. p. 798–804.

PIMENTEL, Therezinha; PUJOL-LUZ, José Roberto. Os gêneros de Raphiocerinae (Diptera, Stratiomyidae) do Brasil e algumas espécies da América do Sul. Parte 2: a tribo Raphiocerini (sensu Schiner). **Contribuições Avulsas sobre a História Natural do Brasil, Série Zoologia, Seropédica**, n. 33, p. 1–31, 2001.

PUJOL-LUZ, José Roberto; LEITE, Fabiana Monteiro. Descrição do último ínstar larval e do pupário de Ptecticus testaceus (Fabr.) (Diptera: Stratiomyidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 587–591, 2001. DOI: 10.1590/S1519-566X2001000400012.

ROZKOŠNÝ, Rudolf; KOVAC, Damir. Descriptions of bamboo-inhabiting larvae and puparia of Oriental soldier flies Ptecticus brunettii and P. flavifemoratus (Diptera: Stratiomyidae: Sarginae), with observations on their biology. **European Journal of Entomology**, v. 95, n. 1, p. 65–86, 1998.

TORRES-TORO, Juliana; GRISALES, Diana; WOLFF, Marta. List of the genera of Stratiomyidae (Diptera: Stratiomyiomorpha) from Colombia based on biological collection records and literature. **Caldasia**, v. 44, n. 3, p. 524–540, 2022. DOI: 10.15446/caldasia.v44n3.91060.

WOODLEY, Norman E. **A world catalog of the Stratiomyidae (Insecta: Diptera)**. Myia, v. 11, p. 1–473, 2001.

CORDERO-JENKINS, L. E.; JIRÓN, L. F.; LEZAMA, H. J. Notes on the biology and ecology of Ptecticus testaceus (Diptera: Stratiomyidae), a soldier fly associated with mango fruit (Mangifera indica) in Costa Rica. **Tropical Pest Management**, v. 36, n. 3, p. 285–286, 1990.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. da S.; MALAVASI, A. Monitoramento populacional. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 109–112.

MACHADO, Gabriela Luiza Carvalho Mendes; FACHIN, Diego Aguilar. Only the beginning: the high species diversity of soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) in a Cerrado

protected area of semideciduous seasonal forests in Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia,** v. 69, n. 1, e20240134, 2025. DOI: 10.1590/1806-9665-RBENT-2024-0134.

FACHIN, Diego Aguilar; AMARAL, Edna Maria; FALASCHI, Rafaela Lopes. Puparium of Merosargus cingulatus Schiner, 1868 and Ptecticus lanei James, 1941 (Diptera: Stratiomyidae: Sarginae), with new geographical records for the species and a list of all known immatures of the subfamily. **Zootaxa**, v. 5406, n. 3, p. 421–440, 2024. DOI: 10.11646/zootaxa.5406.3.2.

JUCKER, Costanza; ERBA, Daniela; LEONARDI, Maria Giovanna; LUPI, Daniela; SAVOLDELLI, Sara. Assessment of vegetable and fruit substrates as potential rearing media for Hermetia illucens (Diptera: Stratiomyidae) larvae. **Environmental Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1415–1423, 2017. DOI: 10.1093/ee/nvx154.

GUDIN, Filipe Macedo; SOARES, Matheus M. M.; FERNANDES, Daniell Rodrigo Rodrigues; RAFAEL, José Albertino. First record of parasitism in soldier flies by tachinids: Lixophaga stratiophaga Gudin, sp. nov. (Diptera: Tachinidae), reared from Ptecticus testaceus (Fabricius) (Diptera: Stratiomyidae) in Amazon rainforest and updated catalogue of dipteran hosts of Tachinidae. **Austral Entomology**, v. 61, n. 4, p. 387–406, 2022. DOI: 10.1111/aen.12620.

RICCARDI, Paula Raile et al. Checklist of the dipterofauna (Insecta) from Roraima, Brazil, with special reference to the Brazilian Ecological Station of Maracá. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 62, e202262014, 2022. DOI: 10.11606/1807-0205/2022.62.014.

Anexos



Figura 1



Tabela 1

CÓDIGO: SB1250

AUTOR: ALICE CRISTINE BEZERRA DE SOUZA

COAUTOR: HILDA RAIANNE SILVA DE MELO

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Padrões de nidificação de aves urbanas em um campus universitário no Rio Grande do Norte, Brasil

Resumo

A expansão urbana modifica ambientes e impacta as estratégias de sobrevivências das espécies. A urbanização afeta também a composição das comunidades e dos ecossistemas locais. Nas aves essa pressão ocorre de diversas formas, tanto na qualidade como na quantidade de recursos naturais, como na sua distribuição espacial devido a fatores potencializados pela antropização. Este trabalho tem como objetivo reunir informações sobre a biologia reprodutiva das aves residentes do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para isso, realizamos o monitoramento reprodutivo das espécies em toda a extensão do Campus entre setembro de 2024 e junho de 2026, identificando ninhos e acompanhando semanalmente o desenvolvimento dos mesmos. O sensoriamento de cada ninho foi feito por meio de aplicativos de GPS, coletamos dados de período de incubação e sucesso reprodutivo, espécie e altura de árvores/suporte dos ninhos, medidas de ovos, comportamentos como cuidado parental. Para coleta de medidas e peso, utilizamos paquímetro, balança de precisão, régua, trena a lazer, câmeras fotográficas e câmera endoscópica e bloco de notas. Como resultados, obtivemos um total de 71 ninhos de 24 espécies residentes distribuídos em 12 famílias, destacando-se nesse período a alta taxa de predação dos ninhos e a utilização de materiais antrópicos na construção dos mesmos. O Campus da UFRN apresenta relevante importância para a reprodução da avifauna urbana, oferecendo importantes recursos.

Palavras-chave: Urbanização; Reprodução de aves; Ninhos.

TITLE: Nesting patterns of urban birds on a university campus in Rio Grande do Norte, Brazil.

Abstract

Urban expansion alters environments and impacts species' survival strategies. Urbanization also affects the composition of local communities and ecosystems. For birds, this pressure manifests in various ways—affecting the quality and quantity of natural resources as well as their spatial distribution due to factors intensified by human-

induced environmental changes. This study aims to gather information on the reproductive biology of resident bird species at the Central Campus of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN). To this end, we monitored the reproductive activity of these species across the entire campus from September 2024 to June 2026, identifying nests and tracking their development on a weekly basis. Nest locations were recorded using GPS applications; we collected data on incubation periods, reproductive success, tree/support species and height, egg measurements, and behaviors such as parental care. Tools used for measurements and weighing included calipers, a precision scale, a ruler, a laser distance meter, cameras, an endoscopic camera, and a notebook. We identified a total of 71 nests belonging to 24 resident species across 12 families; notable findings during this period included high nest predation rates and the use of anthropogenic materials in nest construction. The UFRN campus plays a significant role in the reproduction of urban birdlife by providing essential resources.

Keywords: Urbanization; Bird reproduction; Nests.

Introdução

A crescente expansão urbana, impulsionada pelo aumento da população humana, é um dos principais fatores responsáveis pela perda, fragmentação e degradação de habitats naturais, alterando profundamente a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas (Pineda-Diez-de-Bonilla; Vázquez-Morales; Velázquez-Velázquez, 2025). Nas cidades, a conversão da vegetação em edificações, vias e outras estruturas artificiais reduz a conectividade da paisagem e transforma os remanescentes vegetados em pequenos fragmentos isolados. Esse processo influencia diretamente a composição das comunidades de aves, que passam a responder a um intenso gradiente de urbanização, no qual a disponibilidade de recursos, a conectividade entre áreas verdes e a heterogeneidade ambiental determinam quais espécies conseguem persistir nesses ambientes (Marzluff, 2017; Pineda-Diez-de-Bonilla; Vázquez-Morales; Velázquez-Velázquez, 2025).

A urbanização atua como um forte filtro ambiental, favorecendo espécies generalistas e sinantrópicas, enquanto reduz a ocorrência de espécies especialistas e mais sensíveis às modificações do habitat, promovendo a homogeneização biótica das comunidades (Capilla-Lasheras et al., 2022). Além das mudanças na composição das assembleias, ambientes urbanos também influenciam aspectos da história de vida das aves, como a fenologia reprodutiva, o comportamento de nidificação, o cuidado parental e o sucesso reprodutivo, em resposta às alterações na disponibilidade de alimento, nos locais de nidificação e nas condições microclimáticas (Capilla-Lasheras et al., 2022; Marzluff, 2017).

A sobrevivência das aves em ambientes urbanos depende da capacidade de enfrentar múltiplas pressões ambientais e antrópicas. A poda de árvores durante a estação reprodutiva, a supressão da vegetação, a impermeabilização do solo, a poluição sonora e luminosa, a presença de animais domésticos, espécies invasoras e predadores oportunistas, além do intenso fluxo de pessoas, podem comprometer o comportamento reprodutivo e reduzir o sucesso de nidificação (Glądalski et al., 2016; Reynolds et al., 2019). Estudos conduzidos em uma reserva urbana no estado do Ceará demonstraram que colisões com estruturas artificiais, electrocussões, ataques por animais domésticos e outras interferências associadas às atividades humanas constituem importantes causas de

mortalidade de aves silvestres em ambientes urbanos, evidenciando os impactos diretos da urbanização sobre essas populações (Santos et al., 2019).

Além das perturbações antrópicas, as mudanças climáticas potencializam os efeitos da urbanização sobre a avifauna. O aumento da temperatura decorrente das ilhas de calor urbanas, a alteração dos regimes de precipitação e a maior frequência de eventos climáticos extremos podem modificar a disponibilidade de recursos, alterar a fenologia reprodutiva e reduzir a sobrevivência da prole, afetando diretamente a dinâmica populacional das aves (McCloy et al., 2022; Halupka et al., 2023). A interação entre urbanização e mudanças climáticas representa, portanto, um dos principais desafios atuais para a conservação da biodiversidade em centros urbanos (McCloy et al., 2022).

Apesar do avanço da ecologia urbana nas últimas décadas, ainda existem importantes lacunas sobre a biologia reprodutiva de aves tropicais em ambientes urbanizados (Almeida et al., 2012). No Brasil, informações relacionadas à escolha de sítios de nidificação, cronologia reprodutiva, sucesso de ninhos e comportamento parental permanecem escassas para grande parte das espécies, dificultando a compreensão de como essas populações persistem em paisagens fortemente modificadas e limitando o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo (Marini et al., 2007, 2012; Marini, 2017).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo reunir informações sobre a biologia reprodutiva das aves residentes do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, descrevendo aspectos da nidificação das aves locais.

Metodologia

Área de estudo

A área de estudo ficou delimitada ao Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Realizamos buscas ativas de ninhos de forma aleatória nas áreas arborizadas, vias de pedestres e calçadas, campo de futebol, praças de convivência, áreas de jardim, corredores de salas de aula, canteiros e em um pequeno fragmento preservado de mata atlântica secundária, a Mata dos Saguis, presente no campus (figura 1).

Coleta de dados

O monitoramento foi realizado semanalmente entre setembro de 2024 e junho de 2026, por meio de buscas ativas para a localização de ninhos. Quando os ninhos eram encontrados, utilizava-se uma câmera endoscópica, sempre que necessário, para verificar seu conteúdo, e um aplicativo de GPS para georreferenciar a localização de cada ninho. Medimos a altura dos ninhos em relação ao solo com trena a laser, identificamos (quando possível) o tipo de suporte para o apoio da construção do ninho ou qual a espécie de árvore/planta com base em pesquisas e consultas à especialistas (Macêdo; Lisboa; Carvalho, 2012). Além disso, a obtenção e registros dos dados do período reprodutivo das aves foram observados com o auxílio de binóculos de alcance 10x42. Também realizamos registros fotográficos com câmeras profissionais, a fim de captar cuidado

parental, tipo de item alimentar dado a prole, comportamento de nidificação como seleção ou transporte de material para ninho, interações, entre outros. Além disso, para medir os ovos utilizamos paquímetro, balança de precisão eletrônica para pesagem, e régua para os ninhos.

Por fim, o sucesso reprodutivo foi determinado com base na saída dos filhotes do ninho. Considerou-se que houve sucesso reprodutivo quando pelo menos um filhote sobreviveu até a fase de saída do ninho, independentemente do número de ovos ou filhotes inicialmente registrados (Marini et al., 2010).

Resultados e Discussões

Ao longo do estudo, foram registrados 71 ninhos pertencentes a 24 espécies de aves (Tabela 1). A seguir, são apresentados os registros de nidificação de cada espécie, organizados por família, com destaque para os principais aspectos observados durante o monitoramento.

Columbidae

Columbina talpacoti. Um único ninho foi registrado. Inicialmente observado sem atividade em 14 de novembro de 2025, foi encontrado reativado em 7 de janeiro, contendo dois filhotes em estágio avançado de desenvolvimento (Figura 2, A). O ninho estava a aproximadamente 4 m de altura, em uma árvore de Pau-brasil (Paubrasilia echinata). Na ocasião, os filhotes deixaram o ninho, deslocando-se entre os galhos e permanecendo juntos, caracterizando sucesso reprodutivo.

Columbina picui. Foram registrados três ninhos. O primeiro ocorreu em 9 de outubro de 2025, a aproximadamente 5 m de altura, em uma palmeira (Adonidia merrillii), sem possibilidade de visualização do conteúdo. O segundo foi localizado em 19 de março de 2026, a 6 m de altura, em um Ipê-amarelo (Tabebuia aurea), também sem acesso ao conteúdo (Figura 2, B). O terceiro foi encontrado em 25 de março de 2026, em um algodoeiro-da-praia (Hibiscus tiliaceus), com os dois adultos compartilhando o espaço durante a incubação (Figura 2, C). Poucos dias depois, os filhotes foram observados junto aos adultos fora do ninho. O curto período de desenvolvimento observado é compatível com registros anteriores para a espécie (Marín, 2009; Almeida et al., 2012).

Cuculidae

Guira guira. Foram encontrados três ninhos ativos. O primeiro foi registrado em 2 de dezembro de 2025, a aproximadamente 8 m de altura, em um Ipê-amarelo (Tabebuia aurea). Em 10 de dezembro, cinco filhotes já estavam fora do ninho, ainda com penas em desenvolvimento, enquanto adultos permaneciam nas proximidades e transportavam alimento (Figura 2, D), indicando sucesso reprodutivo.

O segundo ninho foi encontrado em 20 de fevereiro de 2026, na mesma espécie de árvore e a aproximadamente 6 m de altura. Os adultos apresentavam comportamento agitado e transportavam gravetos para o ninho. Durante o monitoramento, foram observadas interações frequentes de adultos nas proximidades e, em 13 de março, dois

filhotes foram encontrados fora do ninho, confirmando o sucesso reprodutivo (Figura 2, E).

O terceiro ninho foi encontrado em 17 de janeiro de 2026, apoiado em uma Carnaúba (Copernicia prunifera), a 3 m de altura, contendo três ovos. Na ocasião, foram observados sete indivíduos ao redor do ninho. Um macho foi registrado chegando à palmeira com um filhote de Iguana iguana no bico, oferecendo-o à fêmea durante uma tentativa de cópula (Figura 2, F). Após a cópula, a fêmea consumiu a presa. Em 27 de janeiro, o ninho continha cinco ovos, azulados e cobertos por calcário (Figura 2, G-H), cujas medidas e massas foram: 29,55 × 38,6 mm e 19 g; 29,4 × 43,6 mm e 18 g; 31,1 × 41,6 mm e 23 g; 31,5 × 42,7 mm e 23 g; e 30,6 × 40,7 mm e 22 g (Figura 2, I). Em 10 de fevereiro, os filhotes estavam desenvolvidos e próximos da saída do ninho, com protopenas e comportamento de observação do ambiente externo (Figura 2, J-K). Em 15 de fevereiro, o ninho estava vazio, compatível com o período de desenvolvimento descrito para a espécie (Payne, 2020).

Crotophaga ani. Um ninho ativo foi encontrado em 31 de março de 2026, em uma árvore de Oiti (Licania tomentosa), a 4 m de altura. O ninho apresentava estrutura externa formada por galhos rígidos e interior forrado com folhas. Em 7 de abril, foram observados seis filhotes com poucos dias de vida e canhões já protuberantes (Figura 2, L). Em 10 de abril, apresentavam penas em desenvolvimento e deslocavam-se para a borda do ninho. Em 16 de abril, já estavam fora do ninho, acompanhando os pais entre os galhos das árvores próximas, caracterizando sucesso reprodutivo.

Trochilidae

Chrysuronia leucogaster. Foram registrados dois ninhos. O primeiro foi encontrado em 2 de dezembro de 2024, em Pau-brasil (Paubrasilia echinata), a 1,60 m de altura, contendo dois ovos. Dois filhotes nasceram, mas apenas um sobreviveu; posteriormente, o ninho foi predado antes do término do desenvolvimento, resultando em insucesso reprodutivo (Figura 3, A-B). O segundo foi encontrado em 16 de setembro de 2025, em Tabebuia aurea, a 1,75 m, contendo um ovo e posteriormente um filhote (Figura 3, C-E). O ninho foi interrompido após poda do galho onde estava instalado, também sem sucesso reprodutivo (Figura 3, F).

Charadriidae

Vanellus chilensis. Um único ninho foi registrado em 10 de janeiro de 2025, contendo três ovos (Figura 3, G). Durante aproximadamente seis dias, um indivíduo permaneceu incubando enquanto o outro permanecia próximo, aparentemente realizando defesa. Em 20 de janeiro, dois filhotes já haviam nascido e permaneciam próximos aos pais, enquanto um ovo ainda não havia eclodido. Em 30 de janeiro, os três filhotes estavam fora do ninho, caracterizando sucesso reprodutivo. Um dos ovos apresentou 40,04 × 30,64 mm e 17,3 g. Embora a espécie possa apresentar nidificação comunitária (Haeberlin et al., 2019), durante o estudo foi observado apenas um casal. A reprodução ocorreu durante a estação chuvosa, coincidindo com o período descrito para a espécie (Santos, 2020).

Rhynchocyclidae

Todirostrum cinereum. Um ninho foi acompanhado a partir de 29 de janeiro de 2026. Em 5 de fevereiro foram observados dois ovos e, posteriormente, filhotes com poucos dias de vida, sem penas e com pele escura ou amarronzada (Figura 3, H). Em 15 de fevereiro, a entrada do ninho encontrava-se danificada, provavelmente após a saída dos filhotes, permitindo inferir sucesso reprodutivo.

Tyrannidae

Elaenia flavogaster. Um ninho foi encontrado em 19 de março de 2026, em uma Craibeira (Tabebuia aurea), com um adulto incubando. Em 25 de março, foi observado um adulto levando alimento ao ninho e cuidando do filhote (Figura 3, I). Em 8 de abril, não havia mais atividade no ninho.

Elaenia spectabilis. Foram registrados dois ninhos. O primeiro foi localizado em 12 de fevereiro de 2026, com um adulto nas proximidades, mas desapareceu antes da inspeção seguinte. O segundo foi encontrado em 16 de fevereiro, contendo dois ovos e um adulto incubando (Figura 3, J-L), em uma árvore de Ipê-amarelo (Handroanthus chrysanthus), a aproximadamente 3,32 m de altura.

Pitangus sulphuratus. Foram registrados sete ninhos durante as temporadas de 2024 e 2025. Em 2024, ocorreram dois registros, em 2 e 26 de dezembro, sem informações sobre o conteúdo devido à altura dos ninhos. Em 2025, foram registrados cinco ninhos, em 9 de janeiro, 12 de fevereiro, 16 de setembro, 18 de novembro e 3 de dezembro. Apenas um ninho pôde ser acompanhado internamente: encontrado em 12 de fevereiro, apresentava um adulto saindo do ninho; em 16 de fevereiro, continha três ovos, permanecendo ativo durante o monitoramento.

Myiozetetes similis. Foram registrados cinco ninhos. O primeiro foi encontrado em 2 de dezembro de 2024 e acompanhado durante a construção e alimentação da prole. Em 15 de janeiro de 2025, foram observados dois filhotes sendo alimentados pelos adultos. Outros ninhos foram registrados em 12 de março e 3 de dezembro de 2025, este último já com um juvenil sendo alimentado. Em 7 de janeiro de 2026, foram encontrados dois ninhos: um em Mata-fome (Pithecellobium dulce), a 6,60 m, com adultos levando alimento aos filhotes; e outro em Sombreiro (Clitoria fairchildiana), a 4,20 m. Neste último, dois filhotes foram observados fora do ninho em 15 de fevereiro, indicando sucesso (Figura 4, B). Outro ninho, encontrado em 12 de fevereiro de 2026 em Craibeira, a aproximadamente 4 m, continha dois filhotes em 15 de fevereiro e juvenis fora do ninho em 14 de março, também confirmando sucesso reprodutivo (Figura 4, C-D).

Fluvicola nengeta. Foram registrados sete ninhos, sendo a espécie com maior número de tentativas reprodutivas. O primeiro foi encontrado em 28 de janeiro de 2025, em Adonidia merrillii, a 3 m de altura, contendo inicialmente dois ovos. Dois dias depois, apresentava sete ovos, alguns menores e com menor quantidade de manchas, sugerindo possível parasitismo por Molothrus bonariensis. O ninho foi posteriormente predado.

Em janeiro de 2026, foram encontrados outros ninhos, incluindo um com dois filhotes sendo alimentados pelos pais e outro, localizado em Sterculia chicha, a 2,50 m, contendo inicialmente um ovo e posteriormente dois. Esse ninho foi abandonado após apresentar danos e perda de um ovo. O casal construiu outro ninho nas proximidades,

em Clitoria fairchildiana, contendo um, posteriormente três ovos. Um filhote nasceu em abril, mas desapareceu posteriormente, e o ninho foi encontrado caído no solo em maio, contendo apenas um ovo não eclodido.

Outro ninho, encontrado em 5 de março de 2026, em Handroanthus heptaphyllus, a 3 m, continha três ovos. Dois filhotes eclodiram e foram acompanhados desde o primeiro dia de vida, com medidas de asa, bico, tarso e massa corporal realizadas a cada dois dias. Após um período de chuvas, ambos morreram em 1º de abril. A comparação das características dos filhotes sugeriu possível parasitismo por M. bonariensis. O ninho foi coletado em 10 de abril, contendo um ovo não eclodido.

Após o insucesso, o casal reconstruiu o ninho em um galho acima do anterior, a aproximadamente 5 m de altura. Em 8 de junho, continha três ovos e, em 10 de junho, foi registrado o nascimento do primeiro filhote. Na última vistoria, em 2 de julho, o ninho estava abandonado, contendo o esqueleto do filhote e dois ovos não eclodidos. No mesmo dia 8 de junho, outro ninho foi encontrado em Adonidia merrillii, com dois ovos. Em julho, restava apenas um ovo e não havia sinais de utilização, indicando abandono.

De modo geral, foram observadas diferentes causas de insucesso para a espécie, incluindo possível predação, abandono, queda de ninhos, mortalidade de filhotes e provável parasitismo por M. bonariensis. Também foi registrada a utilização de materiais antrópicos na construção dos ninhos.

Troglodytidae

Troglodytes musculus. Um único ninho foi encontrado em 19 de maio de 2026, contendo quatro filhotes que vocalizavam intensamente. No dia seguinte, foram observadas visitas frequentes dos adultos transportando alimento. Os filhotes apresentavam plumagem evidente, olhos abertos e comissuras labiais expostas (Figura 4, I). Em 26 de maio, o ninho encontrava-se vazio, indicando saída da prole.

Polioptilidae

Polioptila atricapilla. Um único ninho foi encontrado em 3 de fevereiro de 2025, contendo dois ovos: 14,45 × 11,82 mm e 1,1 g; e 14,53 × 11,46 mm e 1,0 g (Figura 4, J). Em 25 de fevereiro, foram observados adultos de ambos os sexos alimentando os filhotes com larvas, formigas e pequenas mariposas (Figura 4, K-L). O ninho estava a 1,70 m de altura, em um pequeno Pau-brasil (Paubrasilia echinata). Apesar de o local apresentar intenso fluxo de veículos, estudantes, pedestres e funcionários durante o período letivo, o registro ocorreu durante as férias acadêmicas, quando o fluxo era reduzido.

Turdidae

Turdus leucomelas. O primeiro registro ocorreu em 19 de fevereiro de 2024, com dois filhotes sendo alimentados pelos adultos em um ninho apoiado sobre colunas de concreto, a aproximadamente 4 m de altura. Em visita posterior, os filhotes já haviam deixado o ninho, indicando sucesso. Em 3 de dezembro de 2024, outro ninho foi encontrado, contendo três ovos, apoiado em uma parede a aproximadamente 6 m. As

medidas foram: 26,27 × 19,36 mm e 6 g; 25,42 × 19,77 mm e 5,9 g; e 25,58 × 20,44 mm e 6,5 g. Os adultos permaneceram incubando até 12 de dezembro, mas em 23 de dezembro o ninho não foi mais encontrado.

Em 12 de março de 2025, outro ninho foi registrado, sem possibilidade de inspeção. Na temporada de 2026, foram encontrados dois ninhos ativos em 23 de janeiro, ambos com fêmeas incubando. Um estava apoiado sobre um refletor e outro em uma estrutura metálica associada a fios elétricos, evidenciando a utilização de estruturas artificiais como substrato de nidificação.

Mimidae

Mimus gilvus. Em 12 de fevereiro de 2026, foi localizado um ninho que, em 16 de fevereiro, apresentava três ovos em uma árvore de Oiti (Licania tomentosa), a 4,70 m de altura. Na mesma data, outro ninho foi encontrado em Ipê-amarelo (Handroanthus chrysanthus), a 2,63 m, também contendo três ovos (Figura 5, B). As medidas dos ovos foram 23,9 × 19,9 mm e 4,9 g; 24,5 × 19,6 mm e 5 g; e 25,5 × 19,2 mm e 5 g. Em 23 de fevereiro, ambos os ninhos haviam fracassado.

Mimus saturninus. O primeiro ninho ativo foi registrado em 9 de janeiro de 2025, sem visualização do conteúdo. Entre 10 e 15 de janeiro, foram observados três filhotes sendo alimentados pelos pais, que já haviam deixado o ninho em 20 de janeiro, indicando sucesso. Outro ninho foi registrado em 3 de dezembro de 2025, sem confirmação do sucesso. Em 5 de janeiro de 2026, um ninho em construção foi encontrado em uma Mangueira (Mangifera indica), a 3 m. Em 17 de janeiro, continha três ovos e um adulto incubando (Figura 5, C). As medidas dos ovos, obtidas em 27 de janeiro, foram 27,85 × 20,50 mm, 28,35 × 20,05 mm e 28,3 × 20,30 mm, todos com 6 g. Em 10 de fevereiro foram observados três filhotes e, em 18 de fevereiro, o ninho estava vazio.

Icteridae

Cacicus solitarius. O primeiro ninho foi encontrado em 23 de setembro, em uma pequena área de mata relativamente preservada, embora com presença de lixo e gatos domésticos. O ninho estava em uma Mata-fome (Pithecellobium dulce), a aproximadamente 12,57 m de altura, impossibilitando a inspeção do conteúdo. O sucesso foi inferido posteriormente pela observação de quatro indivíduos na área de forrageamento, sendo dois adultos e dois jovens.

Em 22 de janeiro de 2026, foi encontrado outro ninho, ainda mais alto e oculto pela vegetação. Embora seu conteúdo não pudesse ser visualizado, foram observados comportamentos de cuidado parental, incluindo transporte de larvas e minhocas, revezamento dos adultos durante a alimentação e vocalizações de comunicação. Também foram registradas tentativas de predação por saguis (Callithrix jacchus), defendidas ativamente pelos adultos. O período observado coincidiu com a época de nidificação descrita para a espécie (Fraga, 2020).

Thraupidae

Coereba flaveola. Foram registrados vários ninhos ao longo das temporadas de 2024 a 2026. O primeiro, encontrado em 30 de novembro de 2024, não pôde ser inspecionado

devido à altura. Em 15 de janeiro de 2025, outro ninho continha três ovos e, posteriormente, pelo menos dois filhotes, mas desapareceu em 28 de janeiro, com indícios de predação. Em outubro de 2025, foram encontrados novos ninhos, incluindo um construído em um broto lateral de Pilosocereus pachycladus. Este ninho continha três ovos e dois filhotes foram observados posteriormente, porém, em 4 de novembro, estava vazio e apresentava marcas de violação, indicando possível predação (Figura 5, E-F).

Na temporada de 2026, foram registrados ninhos em 7, 15 de janeiro e 5 de fevereiro. O primeiro, construído em Ixora chinensis, a 0,80 m, não apresentou postura. Os demais estavam em Pilosocereus polygonus e Paubrasilia echinata, mas seus conteúdos não puderam ser observados.

Sicalis flaveola. Um ninho foi encontrado em 16 de abril de 2026, construído entre fios e concreto de um poste, a 3,32 m de altura. Dois filhotes eram alimentados pelo macho (Figura 5, G). Em 23 de abril, o ninho apresentava avarias compatíveis com possível predação e não foram mais observados filhotes ou adultos.

Paroaria dominicana. Foram registrados vários ninhos entre 2024 e 2026. O primeiro, encontrado em 2 de dezembro de 2024, continha dois ovos e posteriormente um filhote. Em 27 de dezembro, o monitoramento das 6h30 às 16h30 mostrou intervalos de aproximadamente 2 a 10 minutos entre as visitas dos adultos, que se revezavam no fornecimento de alimento. Outro ninho, encontrado em 26 de dezembro, continha um filhote, mas foi provavelmente predado em 31 de dezembro.

Em janeiro de 2025, um novo ninho foi acompanhado desde a construção, contendo dois ovos em 24 de janeiro e filhotes recém-nascidos em 3 de fevereiro (Figura 5, H). Posteriormente, o ninho foi predado. Outros ninhos foram registrados em outubro e novembro de 2025. Um deles foi retirado do local, interrompendo o desenvolvimento do filhote, enquanto outro foi predado.

Em 4 de março de 2026, um ninho foi reconstruído no mesmo local de uma tentativa anterior e continha dois filhotes recém-nascidos. Em 14 de março, os adultos foram observados alimentando-os com larvas (Figura 5, I). Em 23 de abril, os filhotes já haviam deixado o ninho e juvenis estavam nas proximidades, indicando sucesso. Outro ninho, encontrado em 12 de março, continha três filhotes. Em 26 de março, estes foram resgatados para retirada de parasitas e devolvidos ao ninho. No dia seguinte, houve suspeita de predação por iguanas (Iguana iguana) presentes na área.

Thraupis sayaca. Os primeiros registros ocorreram em janeiro de 2025. Em 15 de janeiro, um filhote foi observado sendo alimentado em um ninho construído em um coqueiro (Cocos nucifera), a 4 m de altura. Em fevereiro, outro ninho continha dois filhotes. Em novembro de 2025, foram encontrados dois ninhos próximos, um com um ovo e um filhote e outro com dois filhotes, sem confirmação do destino final.

Em 7 de janeiro de 2026, foi encontrado um ninho em Tabebuia aurea, a 5,32 m, em uma árvore de aproximadamente 6 m de altura, contendo dois filhotes. Em abril, foram registrados outros dois ninhos: um construído em um poste, a 5,50 m, cujo conteúdo não pôde ser visualizado, e outro em Oiti (Licania tomentosa), a 1,75 m, contendo um filhote. Neste último foi registrada a incorporação de material de origem antrópica na

estrutura do ninho.

Thraupis palmarum. O primeiro ninho foi encontrado em 10 de janeiro de 2025, construído em uma estrutura artificial de um prédio, contendo pelo menos um filhote. Em 22 de janeiro de 2026, outro ninho foi encontrado em Adonidia merrillii, a 3 m, contendo dois filhotes (Figura 5, J). Os adultos retornavam com alimento em intervalos de aproximadamente 3 a 5 minutos. Em fevereiro, os filhotes estavam desenvolvidos e posteriormente foram observados voando nas proximidades, confirmando sucesso reprodutivo.

Stilpnia cayana. Um único ninho foi registrado em 27 de novembro de 2025, em um Jasmim-do-caribe (Plumeria pudica) (Figura 5, K). O conteúdo não pôde ser inspecionado devido à altura. Em 17 de dezembro, um casal foi observado forrageando e retornando ao ninho (Figura 5, L). Em 20 de dezembro, os filhotes foram observados deixando o ninho, confirmando sucesso reprodutivo, embora o número de ovos ou filhotes não tenha sido determinado.

De modo geral, os resultados demonstram que o Campus Central da UFRN constitui uma importante área de reprodução para a avifauna, embora as espécies estejam submetidas a diferentes pressões associadas ao ambiente urbano. A utilização de lixo e outros materiais antrópicos na construção dos ninhos evidencia a capacidade das aves de aproveitar recursos disponíveis em ambientes modificados, comportamento observado em diferentes espécies e gradientes de urbanização (Reynolds et al., 2019; Tariq et al., 2024). Entretanto, esses materiais não apresentam efeitos uniformes sobre o sucesso reprodutivo, podendo, dependendo da espécie e das condições ambientais, não apresentar relação direta ou aumentar a conspicuidade dos ninhos e reduzir a sobrevivência (Reynolds et al., 2019; Jagiello et al., 2023).
Os registros de predação e outras formas de insucesso também evidenciam a importância das interações ecológicas sobre a reprodução em ambientes urbanos. A relação entre urbanização e predação é complexa e varia conforme a espécie, o tipo de ninho e as características da paisagem, não sendo possível atribuir diretamente o fracasso observado à urbanização (Vincze et al., 2017; Ryder et al., 2010). Assim, os dados fornecem uma base para futuros estudos que relacionem uso desses materiais antrópico

Conclusão

Considerando os resultados obtidos, o Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte demonstra relevante importância como área de reprodução para a avifauna, evidenciada pelo registro de ninhos de diversas espécies e pela utilização do ambiente para diferentes estratégias reprodutivas. A presença de 23 espécies reproduzindo no local reforça a importância da conservação da avifauna em ambientes urbanos, uma vez que o registro de ninhos fornece evidências mais diretas de que essas espécies não apenas utilizam o Campus para alimentação ou deslocamento, mas também encontram condições e recursos suficientes para completar parte de seu ciclo reprodutivo.

Além disso, os registros de predação e de utilização de materiais antrópicos evidenciam que, embora o ambiente ofereça condições para a reprodução, as espécies estão sujeitas a

pressões associadas à urbanização. Nesse sentido, o monitoramento contínuo dos ninhos pode contribuir para identificar os principais fatores que influenciam o sucesso reprodutivo, incluindo predação, disponibilidade de recursos, características da vegetação e interferências humanas. Futuramente, estudos que relacionem a estrutura da vegetação, o manejo das áreas verdes, a sazonalidade e as taxas de predação ao sucesso reprodutivo poderão ampliar a compreensão sobre a funcionalidade desses espaços urbanos e subsidiar medidas de manejo, como o planejamento de áreas verdes, a manutenção de árvores utilizadas para nidificação e a redução de intervenções durante o período reprodutivo.

Dessa forma, o Campus pode atuar não apenas como espaço de reprodução, mas também como um importante laboratório natural para o desenvolvimento de pesquisas e ações de conservação da biodiversidade em ambientes urbanos.

Referências

ALMEIDA, S. M.; MAHAL, E. M.; ANJOS-SILVA, E J. Biologia da nidificação de aves no município de Porto Esperidião, Mato Grosso. 2012. Disponível em: <www.ao.com.br>.

CAPILLA-LASHERAS, P. et al. A global meta-analysis reveals higher variation in breeding phenology in urban birds than in their non-urban neighbours. Ecology Letters, 22 nov. 2022. v. 25, n. 11, p. 2552–2570.

FRAGA, R. Solitary Black Cacique (Cacicus solitarius). Em: HOYO, J. DEL et al. (Org.). Birds of the World. [S.l.]: Cornell Lab of Ornithology, 2020.

GLĄDALSKI, M. et al. Effects of human-related disturbance on breeding success of urban and non-urban blue tits (Cyanistes caeruleus). Urban Ecosystems, 22 set. 2016. v. 19, n. 3, p. 1325–1334.

HAEBERLIN, F.; BRUM, A. C.; CORRÊA, L. L. C.; PETRY, M. V. Breeding biology of Vanellus chilensis (Aves: Charadriidae) in a peri-urban area of Southern Brazil. Revista de Ciências Ambientais, Canoas, v. 13, n. 3, 2019. Available from: http://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca. Access on: 24 Aug. 2026. https://doi.org/10.18316/rca.v13i.6070.

JAGIELLO, Z.; DYLEWSKI, Ł.; AGUIRRE, J.I. et al. The prevalence of anthropogenic nest materials differs between two distinct populations of migratory birds in Europe. Environ Sci Pollut Res, 30, 69703–69710 (2023). https://doi.org/10.1007/s11356-023-27156-1

MACÊDO, B. R. M.; LISBOA, C. M. C. A.; CARVALHO, F. G. Diagnóstico e diretrizes para a arborização do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana, v. 7, n. 1, 2012. DOI: https://doi.org/10.5380/revsbau.v7i1.66604

MARÍN, M. Nidificación y crecimiento de la tortolita cuyana (o cuculí) (Columbina picui) en Chile Central. Boletín Chileno de Ornitología, v. 15, n. 1, p. 8-16, 2009.

MARINI, M. Â.; DUCA, C.; MANICA, L. T. Técnicas de pesquisa em biologia reprodutiva de aves. Ornitologia e conservação–ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. Ed. Technical Books, Rio de Janeiro, p. 295-312, 2010.

MARINI, M. Â, RODRIGUES, S. S., SILVEIRA, M. B., GREENEY, H. F. (2012). Reproductive biology of Synallaxis albescens (Aves: Furnariidae) in the cerrado of central Brazil. Biota Neotropica, 12(4). Retrieved from https://www.biotaneotropica.org.br/BN/article/view/1045

MARINI, M. Â. et al.Biologia da nidificação de aves do sudeste de Minas Gerais, Brasil. Revista Brasileira de Ornitologia, v. 15, n. 3, p. 367–376, 2007.

MARINI, M. Â. Nesting success of birds from Brazilian Atlantic Forest fragments. Revista Brasileira de Ornitologia, 30 jun. 2017. v. 25, n. 2, p. 77–83.

MARZLUFF, J. M. A decadal review of urban ornithology and a prospectus for the future. Ibis, 2 jan. 2017. v. 159, n. 1, p. 1–13.

MCCLOY, M. W. D.; ANDRINGA, R. K.; GRACE, J. K. Resilience of Avian Communities to Urbanization and Climate Change: an Integrative Review. Frontiers in Conservation Science, 12 jul. 2022. v. 3.

PAYNE, R. B.; KIRWAN, G. M. Guira Cuckoo (Guira guira). Em: HOYO, J. DEL et al. (Org.). Birds of the World. [S.l.]: Cornell Lab of Ornithology, 2020.

PINEDA DIEZ DE BONILLA, E.; VÁZQUEZ-MORALES, K.; VELÁZQUEZ-VELÁZQUEZ, E. Bird composition of a Neotropical city of Chiapas, México: has a metacommunity structure? Revista de Biología Tropical, 8 jun. 2026. v. 73, n. 1, p. e56527.

REYNOLDS, S. J.; IBÁÑEZ-ÁLAMO, Juan D.; SUMASGUTNER, Petra; MAINWARING, Mark C. Urbanisation and nest building in birds: a review of threats and opportunities. Journal of Ornithology, v. 160, p. 841-860, 2019. Available from: https://doi.org/10.1007/s10336-019-01657-8.

RYDER, T. B.; REITSMA, R.; EVANS, B.; et al. Quantifying avian nest survival along an urbanization gradient using citizen- and scientist-generated data. Ecological Applications, v. 20, n. 2, p. 419–426, 2010.

SANTOS, E. S. A. Southern Lapwing (Vanellus chilensis). Em: SCHULENBERG, T. S. (Org.). Birds of the World. [S.l.]: Cornell Lab of Ornithology, 2020.

SANTOS, G. S.; RIBEIRO, I. C.; CENTODUCATTE, L. D.; MENDES, S. L. Bird breeding biology and homogenization process in an urban green area at Atlantic rainforest of southeastern Brazil. Neotropical Biology and Conservation, v. 14, n. 1, p. 83-98, 2019. DOI: 10.3897/neotropical.14.e34838.

HALUPKA, L. et al. The effect of climate change on avian offspring production: a global meta-analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 120, n. 19, e2208389120, 2023. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2208389120.

SICK, H. (1997) Ornitologia brasileira. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.

TARIK, A.; AHMAD, S. R.; QADIR, A. Nesting material adaptation of native bird species with anthropogenic litter along an urbanization gradient in Pakistan. Environmental Research, v. 249, p. 118435, 2024.

VINCZE, E.; SERESS, G.; LAGISZ, M.; et al. Does Urbanization Affect Predation of Bird Nests? A Meta-Analysis. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 5, 2017.

Anexos



Figura 1: Campus central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lagoa Nova/Natal (RN, Brasil).



Tabela 1. Número de ninhos registrados por espécie e família de aves durante o período de monitoramento reprodutivo realizado no Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.



Figura 2. Registros de Columbina talpacoti, Columbina picui, Guira guira e Crotophaga ani durante o monitoramento de ninhos no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil



Figura 3. Registros de Chrysuronia leucogaster, Vanellus chilensis, Todirostrum cinereum e duas espécies do gênero Elaenia durante o monitoramento de ninhos no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil



Figura 4. Registros de Myiozetetes similis, Fluvicola nengeta, Troglodytes musculus e Polioptila atricapilla durante o monitoramento de ninhos no campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil



Figura 5. Registros de Mimus gilvus, Mimus saturninus, Turdus leucomelas, Cacicus solitarius, Coereba flaveola, Sicalis flaveola, Paroaria dominicana, Thraupis palmarum e Stilpnia cayana durante o monitoramento de ninhos no campus da Universidade Federal

CÓDIGO: SB1252

AUTOR: CLARA DE MELO BARBOZA

ORIENTADOR: MAGNOLIA FERNANDES FLORENCIO DE ARAUJO

TÍTULO: Sustentabilidade no Ensino sobre Peixes: conhecimento sobre esse grupo de animais por meio de exposições imersivas

Resumo

Ocupando o pódio com uma das ictiofaunas mais ricas do mundo, especialmente no que se refere aos peixes de água doce, as águas brasileiras servem de abrigo para uma grande variedade de espécies de peixes. No entanto, grande parte dessa biodiversidade ainda é desconhecida pela população e sofre com ameaças ambientais constantes. Para diminuir esse afastamento são necessárias formas de estreitar a relação da população com as questões científicas, e é justamente nessa junção que a divulgação científica aparece. Museus e centros de ciência são ótimos locais para divulgação científica, pois possuem a capacidade de engajar e despertar curiosidade daqueles que os visitam. É neste contexto que essa pesquisa se apresenta, localizada em um museu de ciência, a exposição imersiva de peixes do semiárido permite que os visitantes sejam transportados para um açude sem precisar se deslocar. Unindo elementos da realidade virtual e aumentada a exposição apresenta os períodos de cheia e seca e os ciclos de vida dos peixes presentes no semiárido potiguar. O objetivo deste trabalho foi coletar a opinião do público para avaliar o impacto da experiência imersiva na percepção ambiental e na compreensão do tema exposto. A pesquisa metodológica foi de natureza quantitativa, exploratória e descritiva, e a obtenção de dados através de um questionário direcionado aos visitantes. Os dados encontrados revelam que a exposição tem um grande potencial no processo de ensino e aprendizagem e conservação.

Palavras-chave: peixes; semiárido; imersão; divulgação científica

TITLE: Sustainability in Fish Education: Knowledge about this Animal Group through Immersive Exhibitions

Abstract

Here is the English translation of your text:

Holding a top spot for one of the world's richest fish populations, mainly freshwater fish, Brazilian waters host a wide variety of species. However, much of this biodiversity is still unknown to the public and faces constant environmental threats. To close this

gap, ways to bring people closer to science are needed, and that is where science communication comes in. Museums and science centers are great places for this, as they can engage visitors and spark their curiosity. In this context, this study looks at an immersive exhibit on semi-arid fish in a science museum that transports visitors to a reservoir without traveling. Using virtual and augmented reality, the exhibit shows wet and dry seasons and the life cycles of local fish in the semi-arid region of Rio Grande do Norte. This study aimed to gather public feedback to evaluate how the experience impacts environmental awareness and topic understanding. The study used quantitative, exploratory, and descriptive methods, collecting data through visitor survey. The results show that the exhibit has great potential for learning and conservation.

Keywords: Fish; Semi-arid region; Immersion; Science communication.

Introdução

A ictiofauna brasileira conta com um expressivo número de espécies (ICMBIO, 2018), demonstrando o quanto as águas do nosso país, abrigam uma rica e importante biodiversidade. Além disso, esse grupo de animais é extremamente relevante do ponto de vista ambiental, social e econômico (Rosa e Lima, 2021). Os peixes estão intimamente ligados com nosso processo evolutivo, desde o compartilhamento de estruturas morfológicas até o fornecimento de alimento e subsistência desde o início da humanidade até os dias atuais (Oliveira e Bemvenuti, 2006).

É essencial compreender e divulgar a complexidade desse grupo, entendendo suas particularidades e desafios, a fim de garantir a manutenção e conservação desses seres (Oliveira et al., 2023). A divulgação científica surge como uma grande aliada, ao permitir a democratização do conhecimento, atuando para que os conhecimentos científicos e tecnológicos estejam ao alcance da população e diminuindo o distanciamento entre a Academia e o cotidiano (Araújo, 2025). Ao fazer isso, os estudantes e o público geral serão capazes de ampliar e desenvolver seus pensamentos críticos para atuar de forma consciente na sociedade.

Espaços não escolares de ensino aparecem como ambientes propícios para a divulgação científica e processos investigativos. Esses locais são ambientes onde seja possível realizar uma ação educativa, esses locais são extremamente favoráveis para incentivar a curiosidade, investigação e participação dos envolvidos (Lima, Araújo e Junior, 2019). Esses espaços são considerados capazes de cativar e promover mudanças comportamentais no público, sendo indispensáveis no processo de ensino e aprendizagem (Araújo, 2025).

Assim, como ambiente promotor de divulgação científica, o Museu Câmara Cascudo da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) apresenta uma sala imersiva sobre peixes do semiárido que une elementos do mundo virtual com o ecossistema de um importante açude local, o Gargalheiras. O projeto também está alinhado a Agenda 2030 da ONU, com impacto direto em dois Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: o ODS 4 (Educação de Qualidade), ao integrar metodologias inovadoras de ensino, e o

ODS 14 (Vida na Água), ao estimular a conservação da biodiversidade e dos ecossistemas aquáticos locais.

A exposição “Peixes do Semiárido: nadando no seco” faz parte do projeto de divulgação científica financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Biodiversidade e Uso Sustentável de Peixes Neotropicais (INCT - Peixes) e oferece uma experiência imersiva ao utilizar tecnologias de realidade virtual e aumentada, contando com projetores e trilha sonora que simulam os períodos de seca e cheia no açude, assim como também o ciclo de vida das principais espécies aquáticas que vivem e dependem dele.

A exposição tem como um dos seus objetivos aproximar o público geral do ecossistema dos açudes do estado a fim de desenvolver atitudes de conservação e pertencimento ambiental. Ao conectar os visitantes a esse ambiente, o qual muitos não tiveram a oportunidade de conhecer ou visitar, é possível estreitar essa relação sem precisar se deslocar até esses locais. De acordo com Marandino (2009), exposições com esse perfil buscam reproduzir de forma “real” os ambientes onde os organismos vivem, proporcionando uma imersão total, como se o público visitasse o habitat original. Essa temática dos peixes nos permite criar uma abordagem interdisciplinar, podendo relacionar os peixes à economia, ecologia, cultura e sociedade. Diante disso, optamos por coletar a opinião do público a respeito da exposição, com o intuito de avaliar o impacto da experiência imersiva na percepção ambiental e compreensão da exposição.

Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido sob uma abordagem quantitativa de natureza exploratória e descritiva (Gerhardt e Silveira, 2009), de acordo com os autores esse tipo de pesquisa foca na objetivada da coleta de dados e na análise estatística. A pesquisa foi realizada no Museu Câmara Cascudo da UFRN, em especial, na sala expositiva “Peixes do Semiárido: nadando no seco” e os participantes foram as pessoas que realizaram a visitação na sala, contando com público externo, comunidade escolar/acadêmica e turistas.

Para avaliar os impactos da exposição de acordo com a opinião do público visitante optamos por realizar um questionário com perguntas mistas ao término da experiência. Este método de coleta de dados tem como objetivo levantar opiniões e expectativas, sendo vantajoso ao atingir um grande número de pessoas em pouco tempo (Gerhardt e Silveira, 2009). Os visitantes tiveram acesso ao questionário com seus próprios aparelhos eletrônicos após a conclusão da experiência através de um QR code. O questionário foi realizado através do google formulários e possui 9 perguntas de múltipla escolha, com alternativas indo desde concordo totalmente até discordo totalmente e 1 pergunta com respostas livres. Ele é dividido em duas sessões, a primeira, uma breve identificação do visitante, já a segunda refere-se ao entendimento da experiência, aprendizagem e impressões gerais.

Resultados e Discussões

Ao todo obtivemos 115 respostas ao decorrer dos anos de 2025 e 2026. Como caracterização do público a maior parte dos visitantes é de jovens adultos com idades entre 19 a 29 anos (36,5%), seguidos de adultos entre 30 a 39 anos (27%). Os menores índices compreendem ao público menor de 18 anos (1,7%), este dado pode ser entendido por conta das dinâmicas dos grupos escolares, normalmente com grande número de alunos, sem acesso ao celular e com um tempo limitado, diferente dos visitantes avulsos. No que se refere ao nível de escolaridade e gênero, a amostra é majoritariamente feminina (60,9%) apresentando um alto nível educacional, concentrando-se entre pós-graduandos (46.1%), e os que cursam ou já concluíram o ensino superior (46%).

Em relação às perguntas sobre a experiência imersiva, para a maior parte dos visitantes a representação do ciclo de vida dos peixes ficou clara durante a experiência, sendo 56.5% das pessoas concordando totalmente e 26.1% concordando parcialmente, os que discordaram equivalem a 7.8% e neutros 9.6%. Em relação a percepção que a sala travava-se de um ecossistema do semiárido, a grande maioria concordou totalmente (59.1%) ou parcialmente (22.6%) e apenas 5.2% discordou de alguma forma. Schinato e Strieder(2020) trazem a importância dos recursos didáticos para uma nova percepção e entendimento a respeito de um tema, sendo capazes de facilitar e desenvolver o senso investigativo. Dessa forma, mesmo que a exposição não tenha uma narrativa explicativa, a partir dos recursos didáticos da exposição os visitantes conseguiram compreender o conceito central e sua proposta.

Quanto aos elementos de identificação e representação de espécies da fauna apresentada na exposição, 40,9% do público conseguiu identificar, com algum grau de dificuldade, algumas espécies de peixes presentes, seguidos de 33.9% reconhecendo sem dificuldade, 14.8% não conseguindo identificar nenhuma, 6.1% apenas uma e por fim 4.3% do público não tem certeza. No que tange os aspectos do ciclo de vida e especificidades da ictiofauna da região, como desova na seca, desenvolvimento e mortalidade, 75.7% dos visitantes conseguiu compreender totalmente ou parcialmente, seguidos de 14.8 % não compreendendo de alguma forma e neutros (9.6%). Esses números apresentam que embora os visitantes não conseguiram reconhecer plenamente as espécies representadas, a compreensão das dinâmicas ecológicas e do ciclo de vida foi bem contemplada. Scalfi e Barata (2019) reforçam que o baixo nível de conhecimento a respeito da fauna nativa pode ser explicado por conta do grande foco da mídia em animais exóticos, especialmente os sul africanos- que estão sempre presentes nos filmes, desenhos, livros e jogos, tornando uma desproporcional competição com a fauna nacional e principalmente local. Por conta desses dados é de suma importância a valorização e divulgação desses temas não só no ambiente escolar e acadêmico, mas também em espaços como museus, parques e centros de ciências e no meio midiático também.

Referente a temática de relevância e aprendizagem, a maioria dos pesquisados concordou totalmente ou parcialmente (82.7%) que a exposição teve impacto na sua compreensão sobre o ecossistema do semiárido e a vida dos peixes na região; 12.2% foi neutro e 5.2% discordou de alguma maneira. Para 86.1% dos visitantes a experiência forneceu uma nova perspectiva e aprendizado referente ao tema, seguidos de 8.7% votos neutros e 5.2% discordando. Os dados demonstram o quão importante é fornecer novas

formas de aprendizado e experiências no ensino de ciências, aproximando o público a temas que antes poderiam ser distantes para eles. Seguindo as reflexões de Síveres, Reis e Arndt (2021, p. 193) “Não existiria uma força transformadora mais poderosa do que a educação para promover a dignidade humana, erradicar a pobreza e aprofundar a sustentabilidade.”

A respeito da impressão geral do público, as respostas foram predominantemente muito positivas(63.5%) e positivas (31.3%), possuindo apenas 4.3% neutra e 0.9% negativa. Ao final do questionário é possível deixar alguma observação, crítica ou sugestão, a maioria das respostas foram elogios acerca da dinamicidade e encantamento da exposição. Também algumas sugestões de melhoria como a inserção de novos cenários e principalmente a adição de uma narração. Essas respostas, se encontram com a visão de Santana, Galivan e Araújo (2025), os quais defendem que as exposições científicas vão além do objetivo de entreter, para eles esses ambientes são propícios para uma reflexão crítica e mudanças socioculturais.

Conclusão

Este estudo revela o quanto a divulgação científica é importante para unir o público da ciência, permitindo novas formas de aprendizado e reflexão. Ao transformar uma exposição sobre peixes em um ambiente imersivo, os visitantes são instigados a explorar por outras perspectivas e estímulos, despertando a curiosidade e engajamento com o conteúdo. Além disso, por meio da exposição também é possível conhecer de perto o ecossistema e espécies da nossa própria região, que muitas vezes são esquecidos e negligenciados, incentivando o público a promover atitudes de conservação e conscientização ambiental. Para o futuro fica a sugestão de novas atualizações no design da exposição adicionando novas espécies ou até outro ecossistema e criação de novas formas de apresentá-la.

Referências

ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio de (org.). Ensinando Ciências no Parque: educação para a sustentabilidade e inclusão em espaço não escolar. Natal: EDUFRN, 2025.

SANTANA, Vinícius Gabriel da Silva; GAVILAN, Simone Almeida; ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio de. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: concepção de docentes em exposição sobre fauna marinha. Retratos da Escola, [S. l.], v. 19, n. 44, p. 779–796, 2025. DOI: 10.22420/rde.v19i44.2097. Disponível em: https://retratosdaescola.emnuvens.com.br/rde/article/view/2097. Acesso em: 30 ago. 2026.

SCHINATO, Liliani Correia Siqueira; STRIEDER, Dulce Maria. Ensino de ciências na perspectiva da educação inclusiva: a importância dos recursos didáticos adaptados na prática pedagógica. Revista Temas em Educação, [S. l.], v. 29, n. 2, 2020. Disponível em:https://periodicos.ufpb.br/index.php/rteo/article/view/43584. Acesso em: 30 ago. 2026.

SÍVERES, Luiz; REIS, Giuliano; ARNDT, Angela. A educação para sociedades sustentáveis. Revista Lusófona de Educação, v. 52, n. 52, p. 183-199, 2021. Disponível em:https://revistas.ulusofona.pt/index.php/rleducacao/article/view/7981. Acesso em: 30 ago. 2026.

GERHARDT, Tatiana Engel; SILVEIRA, Denise Tolfo (org.). Métodos de pesquisa. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. Disponível em:http://hdl.handle.net/10183/52806. Acesso em: 20 ago. 2026.

LIMA, Ana Kaline de; ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio de; ARAÚJO JUNIOR, Josivan Fernandes de. A sustentabilidade em Espaços Não Formais de Ensino: uma revisão no contexto do Ensino de Ciências. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 12., 2019, Natal. Anais [...]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2019. Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/344246357_A_SUSTENTABILIDADE_EM_ESPACOS_NAO_FORMAIS_DE_ENSINO_UMA_REVISAO_NO_CONTEXTO_DO_ENSINO_DE_CIENCIAS. Acesso em: 20 ago. 2026.

MARANDINO, M. A biodiversidade em exposições de imersão de museus de ciências. Enseñanza de las ciencias: revista de investigación y experiencias didácticas, Barcelona, núm. Extra, p. 3424-8, Disponível em: https://raco.cat/index.php/Ensenanza/article/view/294700. Acesso em: 22 ago. 2026.

OLIVEIRA, Antônio Farias de; BEMVENUTI, Marlise de Azevedo. O ciclo de vida de alguns peixes do estuário da Lagoa dos Patos, RS: informações para o ensino fundamental e médio. Cadernos de ecologia aquática, v. 1, n. 2, p. 16-29, 2006.

OLIVEIRA, Francisca Layanne Gomes de et al. Estratégias didáticas para o ensino do conteúdo de peixes: uma revisão de literatura. In: PRATA, Erival Gonçalves (org.). Biologia: contextualizando o conhecimento científico. Guarujá, SP: Editora Científica Digital, 2023. v. 1, p. 110-120. Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/369724806_ESTRATEGIAS_DIDATICAS_PARA_O_ENSINO_DO_CONTEUDO_DE_PEIXES_UMA_REVISAO_DE_LITERATURA. Acesso em: 22 ago. 2026.

ROSA, Ricardo de Souza; LIMA, Flávio César Thadeo de. Os peixes. In: MACHADO, Angelo Barbosa Monteiro; DRUMMOND, Gláucia Moreira; PAGLIA, Adriano Pereira (ed.). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1. ed. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2, p. 9-277. Disponível em:https://biodiversitas.org.br/wp-content/uploads/2021/06/Livro-Vermelho-Brasil-Peixes.pdf. Acesso em: 20 ago. 2026.

CÓDIGO: SB1285

AUTOR: RONALD WICTOR AVELINO DE LIMA

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

COAUTOR: MARCIA VITORIA FERNANDES FERREIRA

COAUTOR: GUILHERME MACEDO DE ARAÚJO MATIAS DA COSTA

COAUTOR: BRIAN CAMPOS PEDREGAL

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Diversidade de Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae) e seus Parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) na Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA-01) – Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte

Resumo

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são pragas agrícolas de impacto econômico mundial, mantendo em fragmentos florestais urbanos reservatórios populacionais e refúgios de biodiversidade. Este trabalho objetivou inventariar tefritídeos, suas plantas hospedeiras e potenciais parasitoides na Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA-01 – Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte), Natal/RN. O monitoramento ocorreu entre agosto de 2025 e junho de 2026, combinando armadilhas McPhail e coletas quinzenais de frutos nativos e exóticos na Subzona de Conservação (SZ1). O esforço somou 40 coletas e 74,67 kg de biomassa processada em laboratório sobre vermiculita. Registraram-se 74 adultos de *Anastrepha*, com razão sexual de 1:1 (37 fêmeas : 37 machos). Observou-se dominância de *Anastrepha obliqua* (95,9%; n=71) em Anacardiaceae (*Spondias mombin, Mangifera indica e Anacardium occidentale*), enquanto *Anastrepha fraterculus* (4,1%; n=3) associou-se à palmeira *Syagrus cearensis*. O cajá (*S. mombin*) teve a maior taxa de infestação (128,81 moscas/kg). A dinâmica temporal indicou pico em maio de 2026 (41 adultos; 55,4%), associado às chuvas e à maturação dos frutos. Não houve emergência de parasitoides (Braconidae). Conclui-se que a SZ1 abriga população estruturada de *A. obliqua*, sendo as fruteiras de borda cruciais na sua manutenção, o que reforça a relevância do monitoramento fitossanitário contínuo no manejo do parque.

Palavras-chave: Anastrepha. Biodiversidade Urbana. Manejo Fitossanitário.

TITLE: Survey of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae), their Parasitoids, and Associated Entomofauna in the Environmental Protection Zone 1 (ZPA-01) – Dom Nivaldo Monte City Park

Abstract

Fruit flies (Diptera: Tephritidae) are major agricultural pests, with urban forest fragments acting as insect reservoirs and biodiversity refuges. This study inventoried tephritid diversity, host plants, and potential parasitoids in Environmental Protection Zone 1 (ZPA-01 – Dom Nivaldo Monte City Park), Natal, RN, Brazil. Monitoring occurred from August 2025 to June 2026, combining McPhail traps and biweekly fruit sampling in the Conservation Subzone (SZ1). The effort totaled 40 collection events and 74.67 kg of biomass processed over vermiculite. A total of 74 adult *Anastrepha* specimens were reared (1:1 sex ratio; 37 females : 37 males). *Anastrepha obliqua* dominated (95.9%; n=71) on Anacardiaceae (*Spondias mombin, Mangifera indica, Anacardium occidentale*), while *Anastrepha fraterculus* (4.1%; n=3) was restricted to the palm *Syagrus cearensis*. Yellow mombin (*S. mombin*) showed the highest infestation rate (128.81 flies/kg). Temporal dynamics revealed a peak in May 2026 (41 adults; 55.4%), linked to rains and fruit ripening. No native parasitoids (Braconidae) emerged. In conclusion, the SZ1 hosts a structured *A. obliqua* population, with edge host plants serving as primary multiplication sites, highlighting the need for continuous phytosanitary monitoring in park management.

Keywords: Anastrepha,Urban conservation units, Tephritidae, Entomological survey

Introdução

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são consideradas uma das pragas mais importantes para agricultura mundial devido ao seu comportamento de oviposição na região do epicarpo, mesocarpo, ou diretamente na semente em frutos, onde as larvas se desenvolvem alimentando-se de sua polpa (Aluja, 1994). Devido ao perigo econômico causado por essas moscas, sendo capazes de causar US$ 242 milhões/ano em perdas na economia do Brasil por exemplo (Oliveira et al., 2012) e sua capacidade de invadir regiões distantes de sua área endêmica, diversos países possuem políticas estritas com relação a quarentena em processos de comércio internacional para impedir a introdução destes insetos em seu território (Qin et al., 2015).

O estado do Rio Grande do Norte (RN) é um dos principais produtores de frutos tropicais do Nordeste (Costa, 2011; Basílio, 2026), onde há um investimento constante no monitoramento e controle das moscas-das-frutas para garantir a exportação de seus produtos vegetais (Sousa et al., 2019), em especial o monitoramento de *Anastrepha grandis* para manter a região como Zona Livre da Praga *Anastrepha grandis* (Basílio, 2026). Além disso, existe a ocorrência de outras moscas do gênero *Anastrepha* (Schiner, 1868) e do gênero *Ceratitis* (Macleay, 1829) no Rio Grande do Norte, com ambos tendo importância econômica (Araújo et al., 2005; Basílio, 2026). Uma das medidas criadas para se realizar o controle populacional das moscas-das-frutas como forma alternativa

ao agrotóxico de forma que se garanta a qualidade do produto e a saúde do consumidor é o biocontrole realizado por parasitóides, sendo o grupo de maior interesse as vespas pertencentes à família Braconidae (Canal et al., 1995), com essa família tendo registro na região semiárida do Rio Grande do Norte (Araújo; Zucchi, 2002).

O município de Natal, capital do estado Rio Grande do Norte, possui diversas Zonas de Proteção Ambiental (ZPAs), dentre elas a ZPA-01 definida pela Lei Municipal no 4.664/1995 de 31 de julho de 1995 e onde se localiza o Parque Natural Municipal da Cidade do Natal, também chamado de Parque da Cidade do Natal Dom Nivaldo Monte, uma Unidade de Conservação (UC) pertencente ao grupo Unidades de Proteção Integral na categoria Parque Nacional Municipal, localizada às margens da Avenida Omar O' Grady dentro da Sub Zona de Conservação (SZ1-A) da ZPA-01. Essa UC contém fragmentos de Mata Atlântica e espécies características dos ambientes de Caatinga e de Cerrado. Considerando a permissão para a pesquisa científica como prevista no plano de manejo do parque e de acordo com o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), o uso desta região para a coleta de espécimes se demonstra ideal.

Com a importância econômica das moscas-das-frutas para a região potiguar em mente e a falta de estudos de sua frequência na região de Mata Atlântica do Rio Grande do Norte que permitam a criação de um programa de manejo integrado de pragas, se faz necessária a coleta de dados deste grupo de dípteros juntamente com os de seus parasitóides na região. Assim, esta pesquisa teve como objetivo a identificação da densidade populacional, diversidade e frequência de moscas do gênero *Anastrepha* e *Ceratitis* juntamente com a identificação de seus parasitóidesna região de Mata Atlântica presente no Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte no Rio Grande do Norte para assim verificar a influência do bioma e região na frequência populacional de moscas-das-frutas, identificar quais espécies vegetais são parasitadas, se há preferência pelos hospedeiros nativos, quais parasitóides de moscas-das-frutas existem na região, quais parasitóides são mais frequentes, quais espécies de moscas são mais parasitadas, e realizar um registro atual da população de moscas-das-frutas no município de Natal/RN.

Metodologia

Diante do impacto socioeconômico gerado pelas moscas-das-frutas para a fruticultura potiguar e da carência de diagnósticos ecológicos em remanescentes de Mata Atlântica sobre dunas, o presente trabalho teve como objetivo inventariar a diversidade de tefritídeos (Diptera: Tephritidae), suas plantas hospedeiras e potenciais parasitóides na Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA-01 – Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte), Natal/RN, avaliando a abundância, a preferência por hospedeiros e a dinâmica de infestação ao longo do período amostral.

O trabalho foi conduzido na Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA-01), especificamente na Subzona de Conservação (SZ1) do Parque Natural Municipal da Cidade do Natal Dom Nivaldo Monte e áreas contíguas do Centro de Experimentos e Pesquisas da Mata Atlântica (CEPEMA), Natal/RN (coordenadas de referência: 5°51′60″ S, 35°13′69″ W e 5°50′86″ S, 35°14′71″ W; altitude média de 55 a 65 m) (COSTA, 1999; NATAL, 2020). De acordo com a classificação climática de Köppen, a região apresenta clima tropical

chuvoso do tipo As', com estação chuvosa concentrada no verão-outono e estiagem no período de inverno-primavera, precipitação média anual de 1.733,6 mm e ventos alísios de sudeste (COSTA, 1999). A área possui 154 hectares de dunas com cobertura vegetal nativa fixadora e espécies frutíferas hospedeiras primárias.

As coletas de campo ocorreram entre agosto de 2025 e junho de 2026. Inicialmente, foram distribuídas quatro armadilhas plásticas do tipo McPhail iscadas com proteína hidrolisada a 5% (Biofruit) tamponada, instaladas nas copas das árvores ao longo das trilhas pavimentadas da SZ1. Devido à baixa atratividade observada em campo, a metodologia concentrou-se no esforço sistemático de coletas quinzenais de frutos maduros, em fase final de maturação e recém-caídos com indícios de pontuações de oviposição ou consumo larval, abrangendo espécies nativas do campo dunar e árvores frutíferas exóticas do entorno e zonas de amortecimento.

No laboratório do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN, os lotes de frutos foram triados, pesados em balança de precisão e acondicionados individualmente por espécie vegetal em recipientes plásticos de emergência, utilizando vermiculita expandida umedecida como substrato basal para a formação dos pupários. Semanalmente, o substrato era submetido a peneiramento para triagem e recuperação dos pupários e adultos recém-emergidos, sendo os pupários transferidos para frascos de acrílico até a emergência dos imagos (tefritídeos ou parasitoides). As amostras permaneceram sob acompanhamento por até três semanas com substituição periódica do substrato. Os insetos adultos obtidos foram fixados em álcool etílico a 70%, quantificados, sexados e identificados com auxílio de microscópio estereoscópico e chaves taxonômicas especializadas.

Resultados e Discussões

De forma geral, os resultados obtidos na SZ1 do Parque da Cidade convergem para um cenário em que a comunidade de tefritídeos é numericamente dominada por uma única espécie generalista (*Anastrepha obliqua*), fortemente dependente de fruteiras de borda e do entorno (Anacardiaceae), e aparentemente livre de pressão de controle biológico natural por Braconidae, um conjunto de evidências que, tomado em bloco, aponta para uma unidade de conservação urbana funcionando mais como reservatório de pragas do que como refúgio equilibrado de biodiversidade entomológica, ao menos no que se refere a esse grupo. As subseções a seguir discutem cada uma dessas linhas de evidência à luz da literatura disponível.

4.1 Caracterização Geral da Amostragem e Abundância Faunística

O esforço amostral resultou na realização de 40 eventos de coleta de frutos, totalizando 74,67 kg de biomassa vegetal processada em laboratório. A partir da incubação do material e triagem dos pupários, obteve-se a emergência de 74 indivíduos adultos de moscas-das-frutas pertencentes exclusivamente ao gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). A razão sexual global evidenciou simetria de 1:1, registrando-se 37 fêmeas (50%) e 37 machos (50%).

Esse volume amostral é comparável, em ordem de grandeza, ao de outros levantamentos regionais de tefritídeos associados a frutos nativos e cultivados no Nordeste e na Amazônia brasileira (ARAÚJO et al., 2005; JESUS-BARROS et al., 2012; OHASHI et al., 1997), o que confere robustez relativa ao inventário obtido, ainda que restrito a um único ciclo anual e a uma única unidade de conservação urbana.

4.2 Levantamento Taxonômico e Associação Hospedeiro-Inseto

A exclusividade do gênero *Anastrepha* nas amostras, sem registro de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), espécie amplamente distribuída no Rio Grande do Norte (ARAÚJO et al., 2005; BASÍLIO, 2026) sugere que, na SZ1 do Parque da Cidade, os hospedeiros disponíveis (frutos carnosos de Anacardiaceae e Arecaceae) favorecem preferencialmente a colonização por espécies nativas do gênero *Anastrepha*, historicamente mais associadas a esses grupos vegetais do que *C. capitata,* cujo espectro de hospedeiros tende a incluir mais frutos exóticos suculentos de outras famílias.

A dominância de *Anastrepha obliqua* (95,9%) é consistente com o caráter generalista já descrito para essa espécie, que ataca frutos de dezenas de espécies vegetais, com clara preferência pela família Anacardiaceae (OHASHI et al., 1997). A concentração das emergências em *Spondias mombin, Mangifera indica e Anacardium occidentale* reforça essa tendência e indica que, no contexto urbano estudado, são justamente as fruteiras de borda e do entorno, muitas delas exóticas ou cultivadas, que sustentam a manutenção populacional da espécie, e não a vegetação nativa de duna propriamente dita.

Já a ocorrência pontual de *Anastrepha fraterculus* associada exclusivamente a *Syagrus cearensis* (catolé) é um resultado que merece leitura cautelosa. A emergência de tefritídeos a partir de frutos de Arecaceae não consta entre as associações hospedeiras classicamente descritas para o gênero (ALUJA, 1994; ZUCCHI et al., 2011), o que reforça a hipótese, já levantada pelos autores, de oviposição oportunista em polpa em decomposição ou de contaminação cruzada durante a incubação em bancada. Para estudos futuros, recomenda-se o isolamento físico de lotes de diferentes espécies vegetais em salas ou bancadas distintas, bem como a inclusão de frutos-controle não expostos a campo, de modo a descartar definitivamente a hipótese de contaminação laboratorial antes de se firmar *S. cearensis* como hospedeiro efetivo de *A. fraterculus.*

Os dados obtidos em campo e laboratório foram tabulados e organizados em planilhas eletrônicas utilizando o software Microsoft Excel® / Google Sheets. A taxa de infestação absoluta por hospedeiro foi calculada por meio da razão entre o número total de adultos de moscas-das-frutas emergidos e a massa total da amostra vegetal em quilogramas (moscas/kg de fruto). A nomenclatura e as autoridades taxonômicas das espécies vegetais foram padronizadas mediante consulta às bases de dados internacionais Catalogue of Life e Flora e Funga do Brasil. Para a curadoria dos dados, processamento estatístico descritivo e geração dos gráficos de abundância e dinâmica temporal de infestação, utilizou-se a linguagem de programação Python (bibliotecas Pandas, Matplotlib e Seaborn) com suporte analítico do modelo de linguagem Gemini (Google AI).

4.3 Análise da Taxa de Infestação e Preferência por Hospedeiro

A elevada taxa de infestação registrada em *Spondias mombin* (128,81 moscas/kg), mesmo a partir de um volume amostral reduzido (0,295 kg), é coerente com o padrão relatado em outras regiões do Brasil, nas quais o cajá figura recorrentemente como um dos hospedeiros mais infestados e mais frequentemente associados a *A. obliqua* (JESUS-BARROS et al., 2012; DIAS-PINI et al., 2021). Esse padrão sugere que, mesmo em baixa disponibilidade de frutos, *S. mombin* funciona como um hospedeiro de alta atratividade e adequação larval para a espécie, provavelmente em razão da polpa mole e de fácil penetração pelo ovipositor.

Em contraste, *Anacardium occidentale* (caju), apesar de nativo da região e de compor o mesmo grupo taxonômico preferencial (Anacardiaceae), apresentou taxa de infestação consideravelmente menor (0,36 moscas/kg). Essa diferença pode estar relacionada a características morfológicas do pseudofruto (pedúnculo fibroso e casca mais espessa em comparação à polpa de *S. mombin*), que podem dificultar a oviposição ou reduzir a sobrevivência larval, hipótese que poderia ser testada em ensaios futuros de escolha de hospedeiro (choice tests).

O caso de *Syagrus cearensis*, discutido no item 4.2, reforça-se aqui pelo contraste entre o alto volume amostrado (15 coletas; 13,06 kg) e a baixíssima taxa de infestação (0,23 moscas/kg), disparidade que corrobora a interpretação de associação marginal ou acidental, e não de hospedeiro primário.

4.4 Dinâmica Temporal e Flutuação Populacional

Um dos resultados mais relevantes do estudo é a completa ausência de emergência de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae, Figitidae ou Pteromalidae) ao longo de todo o período de incubação. Esse achado contrasta com o que tem sido sistematicamente registrado em levantamentos análogos conduzidos em outras regiões do Brasil, nos quais *Spondias mombin* figura justamente como um dos hospedeiros com maiores índices de parasitismo natural por Braconidae. Em Amapá, por exemplo, o parasitismo em amostras de S. mombin atingiu 8,45%, com *Doryctobracon areolatus* como espécie dominante (JESUS-BARROS et al., 2012); no Pará, quatro espécies de Braconidae (entre elas *D. areolatus*, *Opius bellus* e *Utetes anastrephae*) foram recuperadas de frutos de Anacardiaceae infestados por *A. obliqua* (OHASHI et al., 1997); e, mais recentemente, um estudo no Acre registrou parasitismo natural de *D. areolatus* em *A. obliqua* associada a *S. mombin* superior a 30% (estudo de 2026, Rio Branco/AC).

Diante desse contraste, a ausência total de parasitoides na ZPA-01 dificilmente pode ser atribuída apenas a limitações amostrais e merece ser discutida como um resultado ecológico em si, com pelo menos três hipóteses não excludentes:

Efeito de fragmentação e isolamento urbano: Parques urbanos cercados por matriz antrópica podem sofrer perda de complexos de inimigos naturais associados a hospedeiros específicos, um fenômeno já discutido para tefritídeos em paisagens fragmentadas (ALUJA, 1994). A SZ1 do Parque da Cidade, delimitada por avenidas e áreas urbanizadas, pode estar funcionando como um fragmento relativamente isolado das fontes de recolonização de parasitoides braconídeos.

Limitações do protocolo de incubação: o acompanhamento de até três semanas, embora adequado para a maioria dos tefritídeos, pode ser insuficiente para capturar a

emergência de parasitoides com desenvolvimento mais longo ou sujeitos a diapausa pupal, o que poderia gerar subestimativa (e não ausência real) do parasitismo local.

Manejo fitossanitário do entorno: o uso de agroquímicos em pomares domésticos e comerciais no entorno da unidade de conservação, embora não tenha sido objeto de mensuração neste estudo, é um fator historicamente associado à redução de populações de parasitoides Braconidae, por sua maior sensibilidade a inseticidas em comparação aos tefritídeos hospedeiros.

Recomenda-se que estudos subsequentes estendam o período de acompanhamento pós-coleta (para além de três semanas) e considerem o método de "frutos-sentinela" (sentinel fruits) para estimar de forma mais robusta as taxas reais de parasitismo natural na área.

Conclusão

O inventário entomológico conduzido na Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA-01 – Parque da Cidade Dom Nivaldo Monte) diagnosticou, de forma pioneira, a dinâmica da comunidade de tefritídeos em ambiente dunar urbano. O estudo confirmou a colonização ativa do gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), revelando que a unidade de conservação atua como reservatório de praga agrícola de importância econômica, sustentada por hospedeiros de borda e sem controle biológico natural aparente.

Constatou-se dominância expressiva de *Anastrepha obliqua* (95,9% da abundância), espécie generalista associada à família Anacardiaceae, com emergências concentradas em *Spondias mombin, Mangifera indica* e *Anacardium occidentale*, fruteiras exóticas ou cultivadas do entorno, e não a vegetação nativa de duna. Destaca-se a alta taxa de infestação em cajá (128,81 moscas/kg), padrão compatível com a literatura nacional que confirma *S. mombin* como o principal sítio de multiplicação na área. Já *Anastrepha fraterculus* teve ocorrência restrita (4,1%) e associação exclusiva à palmeira nativa *Syagrus cearensis* (catolé), registro atípico que requer cautela e confirmação em estudos futuros com controle rigoroso de contaminação laboratorial.

Um dos achados mais relevantes foi a ausência total de parasitoides nativos (Hymenoptera: Braconidae) nos frutos processados. Em contraste com outras regiões do país, onde o cajazeiro apresenta elevados índices de parasitismo natural, o resultado indica que a Subzona de Conservação (SZ1) não se encontra equilibrada quanto ao controle biológico. Soma-se a isso a baixa atratividade das armadilhas McPhail, evidenciando limitações metodológicas e os impactos da fragmentação urbana sobre os inimigos naturais. A flutuação temporal revelou pico populacional em maio de 2026, sincronizado às chuvas e à frutificação das Anacardiaceae, fornecendo um padrão sazonal previsível para o manejo.

Esse cenário, marcado por hospedeiros abundantes nas bordas, ausência de parasitoides e pico sazonal definido, exige monitoramento fitossanitário contínuo e georreferenciado

na unidade, com ênfase no recolhimento e destinação de frutos caídos para mitigar a reinfestação de pomares urbanos em Natal/RN.

Para pesquisas futuras, recomenda-se: (i) uso de atraentes alimentares específicos (putrescina e acetato de amônio) em malha de armadilhas estratificada verticalmente; (ii) extensão do período de observação laboratorial pós-coleta para registrar parasitoides de ciclo tardio; (iii) emprego de frutos-sentinela para avaliar o parasitismo a campo; e (iv) expansão da amostragem para outras espécies vegetais nativas em ciclos plurianuais. Os dados obtidos subsidiam a atualização do Plano de Manejo da ZPA-01 e as diretrizes municipais de vigilância fitossanitária (Lei nº 4.664/1995).

Referências

ALUJA, M. Bionomics and management of Anastrepha. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 155-178, jan. 1994. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001103.

ARAUJO, E. L. et al. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no semi-árido do Rio Grande do Norte. Neotropical Entomology, Londrina, v. 34, n. 6, p. 889-894, dez. 2005. DOI: https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600003.

ARAUJO, E. L.; ZUCCHI, R. A. Parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 64-68, 2002. DOI: https://doi.org/10.1590/1808-1657v69n2p0652002.

DIAS-PINI, N. S.; MACIEL, G. P. S.; SARAIVA, W. V. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) associadas às frutíferas nativas de Spondias spp. (Anacardiaceae) e Ximenia americana L. (Olacaceae) e seus parasitóides no estado do Piauí, Brasil. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa, n. 229.

BASÍLIO, J. V. N. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Rio Grande do Norte, Brasil: diversidade, aspectos ecológicos e morfometria. 2026. 203 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2026.

CANAL, N. A. D. et al. Análise faunística dos parasitóides (Hymenoptera, Braconidae) de Anastrepha spp. (Diptera, Tephritidae) em Manaus e Iranduba, Estado do Amazonas. Acta Amazonica, Manaus, v. 25, n. 3-4, p. 235-245, 1995. DOI: https://doi.org/10.1590/1809-43921995253246.

COSTA, A. M. B. Alternativa para o gerenciamento do lixo urbano em Natal/RN: uma proposta. 1999. Monografia (Especialização) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 1999.

COSTA, G. M. M. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitóides (Hymenoptera: Braconidae), em pomares domésticos, nos municípios de Apodi e

Baraúna, Rio Grande do Norte. 2011. 68 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

NATAL (Município). Lei nº 4.664, de 31 de julho de 1995. Dispõe sobre o uso do solo, limites e prescrições urbanísticas da Zona de Proteção Ambiental 1 (ZPA-01), do campo dunar existente nos bairros de Pitimbu, Candelária e Cidade Nova, no Município do Natal. Diário Oficial do Município, Natal, RN, 1995.

NATAL (Município). Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo (SEMURB). Plano de Manejo do Parque Natural Municipal da Cidade do Natal Dom Nivaldo Monte. Natal: Prefeitura Municipal do Natal, 2020.

OLIVEIRA, C. M. et al. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. Journal of Applied Entomology, v. 137, n. 1-2, p. 1-15, nov. 2012. DOI: https://doi.org/10.1111/jen.12018.

QIN, Y. et al. Global establishment risk of economically important fruit fly species (Tephritidae). PLoS ONE, v. 10, n. 1, p. e0116424, jan. 2015. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116424.

SOUSA, M. M. et al. Fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in a semiarid region of Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 41, n. 5, e-347, 2019. DOI: https://doi.org/10.1590/0100-29452019347.

OHASHI, O. S.; DOHARA, R.; ZUCCHI, R. A.; CANAL, N. A. Ocorrência de Anastrepha obliqua (Macquart) (Diptera: Tephritidae) em acerola Malpighia punicifolia L. no estado do Pará. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, v. 26, n. 2, 1997.

JESUS-BARROS, C. R. et al. Anastrepha (Diptera: Tephritidae) Species, Their Hosts and Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) in Five Municipalities of the State of Amapá, Brazil. Florida Entomologist, v. 95, n. 3, 2012.

ZUCCHI, R. A.; URAMOTO, K.; SOUZA-FILHO, M. F. Chave ilustrada para as espécies de Anastrepha (Diptera: Tephritidae). 2011.

Anexos



Figura 1 – Abundância total de moscas-das-frutas (Anastrepha spp.) emergidas por espécie hospedeira na ZPA-01 (Parque da Cidade), Natal/RN.



Figura 2 – Dinâmica temporal da emergência de adultos e taxa de infestação de Anastrepha obliqua ao longo do período amostral na ZPA-01 (Parque da Cidade), Natal/RN.



Tabela 1 – Síntese das coletas de frutos, emergências de tefritídeos e taxa de infestação por espécie vegetal na ZPA-01 (Parque da Cidade), Natal/RN.

CÓDIGO: SB1295

AUTOR: LUCA DE MELO MOLLIK

COAUTOR: MAISA GOMES DA SILVA

COAUTOR: JHONATAN RAFAEL GOMES DA SILVA

COAUTOR: ANA PAULA GARCIA DELGADO

COAUTOR: MARIA ELOISA GOMES TEIXEIRA PEIXOTO

COAUTOR: MARIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ANAMARIA DAL MOLIN

TÍTULO: COMPARAÇÃO DE PERFIS DE ENTOMOFAUNA CAPTURADA POR ARMADILHAS MALAISE EM ÁREAS SUJEITAS A DIFERENTES NÍVEIS DE INFLUÊNCIA URBANA

Resumo

O considerável declínio das populações de insetos traz questões relacionadas ao impacto deste fenômeno nos ecossistemas terrestres. Uma fração muito pequena das espécies de insetos é conhecida e estudada, ao se comparar com vertebrados, e para as mais de um milhão de espécies catalogadas, não se sabe quase nada sobre sua biologia, distribuição e abundância. Atualmente, já se debate o efeito negativo que a ação humana têm sobre as populações de insetos. Assim, o monitoramento contínuo das comunidades desses organismos é fundamental para determinar quando e onde essas populações estão em declínio. Armadilhas de interceptação de vôo, como a Malaise, permitem a coleta de uma grande variedade de espécies, realizam a amostragem passiva de insetos durante o dia e a noite, e permitem a padronização e consequente comparação entre diversos ecossistemas, tornando-se uma das ferramentas mais importantes em termos de estudos faunísticos de Insecta. O estado do Rio Grande do Norte carece de pesquisas acerca da sua entomofauna. Dessa forma, o presente trabalho contribui para este conhecimento, comparando o perfil da entomofauna capturada por armadilhas Malaise de duas localidades de mata atlântica com diferentes níveis de influência urbana, o Parque das Dunas de Natal e a Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta.

Palavras-chave: Insetos. Mata atlântica. Urbanização

TITLE: COMPARISON OF ENTOMOFAUNA PROFILES CAPTURED BY MALAISE IN AREAS SUBJECT TO DIFFERENT LEVELS OF URBAN INFLUENCE

Abstract

A significant decline in insect populations raises questions regarding the impact of this phenomenon on terrestrial ecosystems. Compared to vertebrates, only a small fraction of insect species has been studied, and for the more than one million cataloged species, almost nothing is known about their biology, distribution, and abundance. The negative impact of human activity on insect populations is currently a subject of debate. Given that insects provide various essential ecosystem services, continuous monitoring of these communities is crucial for identifying when and where populations are in decline. Flight-interception traps, such as Malaise traps, enable the collection of a wide variety of species and minimize capture bias by passively sampling insects day and night, making them one of the most important tools for insect collection. The state of Rio Grande do Norte lacks research on its insect fauna; therefore, this study contributes to filling this knowledge gap by comparing the insect fauna profiles obtained via Malaise traps at two Atlantic Forest sites with differing levels of urban influence: Natal's Parque das Dunas and the Nísia Floresta National Forest (FLONA).

Keywords: Insects. Atlantic forest. Urbanization

Introdução

Os insetos são um dos mais diversos e abundantes grupos de animais terrestres, e estão intimamente relacionados ao equilíbrio ecológico de muitos ecossistemas no planeta. Sabe-se que insetos desempenham as mais variadas funções ecológicas, como polinização, decomposição, predação, entre outros. No entanto, a crescente expansão urbana influencia diretamente os padrões de diversidade e abundância de vertebrados e invertebrados, afetando o funcionamento, estabilidade e disponibilidade de serviços ecossistêmicos fundamentais para a manutenção das sociedades humanas (Piano, et al., 2019). Além disso, o considerável declínio das populações de insetos no mundo traz questões relacionadas ao impacto deste fenômeno nos ecossistemas terrestres (Cardoso, et al., 2020; Wagner, 2020; Wagner, et al. 2021). Até hoje foram descritas mais de um milhão de espécies de insetos, equivalente a cerca de 70% das espécies descritas de animais e 52% de todas as espécies descritas no planeta (Rafael, et al., 2024). Entretanto, uma fração muito menor das espécies de insetos é conhecida e estudada, ao comparar com vertebrados, e para as mais de um milhão de espécies catalogadas, não se sabe quase nada sobre sua biologia, distribuição e abundância (Goulson, et al. 2019). Portanto, confirma-se a necessidade de estudos acerca da diversidade e distribuição de insetos.

Atualmente, já se debate o efeito negativo que a ação humana têm sobre as populações de insetos (Thomazini; Thomazini, 2002), bem como a degradação

de importantes ecossistemas como a Mata Atlântica, que caracteriza-se por ser um bioma natural intensamente interrompido por barreiras antrópicas (Lima et al., 2010). Dados recentes sugerem um padrão geral de declínio na diversidade e abundância de insetos, motivado principalmente pela perda, fragmentação, deterioração e redução na qualidade de habitats, bem como mudanças climáticas nos últimos anos (Hallmann et al., 2017). Assim, como insetos provêm diversos serviços essenciais aos ecossistemas, o monitoramento contínuo das comunidades desses organismos é fundamental para determinar quando e onde essas populações estão em declínio, bem como os fatores que ocasionam este fenômeno, a fim de desenvolver estratégias específicas para mitigar este efeito (Uhler et al., 2022). Portanto, o projeto Lifeplan, ao qual este trabalho está vinculado, busca construir a primeira base de dados global, com ampla cobertura espacial e temporal, avaliando como os processos de urbanização locais e regionais influenciam padrões de abundância e diversidade em escala planetária.

Para melhor e mais precisa amostragem, são necessários diferentes métodos de coleta, dada a grande diversidade de espécies de insetos e suas exigências de coleta e armazenamento (Camargo et al., 2015). Porém, armadilhas de interceptação de vôo permitem a coleta de uma grande variedade de espécies e reduzem erros na captura ao realizar amostragem passiva de insetos durante o dia e a noite, tornando-se uma das ferramentas mais importantes em termos de captura. Além disso, armadilhas Malaise, além de capturarem primariamente insetos voadores, podem também capturar espécimes habitantes de solo. Dessa forma, esse tipo de amostragem é expressivamente eficaz em estudos que buscam obter dados mais sólidos sobre as comunidades locais de insetos, sendo práticas para o monitoramento em longo prazo por exigirem baixa manutenção (Karlsson et al., 2020; Uhler et al., 2022).

O estado do Rio Grande do Norte carece de pesquisas acerca da sua entomofauna, contando apenas com 789 registros formais de espécies de insetos, em comparação com 10684 para a região Nordeste e 92450 para o Brasil (CTFB - http://fauna.jbrj.gov.br). Dessa forma, o presente trabalho contribui para o conhecimento da entomofauna do estado, analisando e comparando o perfil da entomofauna de duas localidades de mata atlântica com diferentes níveis de influência urbana, o Parque das Dunas de Natal e a Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta.

Metodologia

A análise incluiu amostras de duas localidades inseridas no bioma de Mata Atlântica no Rio Grande do Norte: a Floresta Nacional (FLONA) do município de Nísia Floresta (6°5’S, 35°12’W) e o Parque Estadual das Dunas de Natal (PDD), na capital do estado (5°49’S, 35°11’W). Embora ambas estejam localizadas no bioma de Mata Atlântica, a Floresta Nacional de Nísia Floresta se encontra em uma área de menor influência antrópica, em ambiente de floresta preservada, já o Parque das Dunas se insere em área urbana da cidade de Natal. As duas localidades se situam em área com clima tropical do tipo Aw (Köppen),

caracterizado por apresentar uma das estações do ano seca, com o mês mais seco tendo precipitação média abaixo de 60mm (McKnight; Hess, 2000). Além disso, tanto o Parque das Dunas de Natal quanto a FLONA de Nísia Floresta se localizam em áreas planas cercadas por uma vegetação alta, característica de uma floresta ombrófila (Radam Brasil, 1981), com grande quantidade de serrapilheira.

Para a amostragem, foram utilizadas armadilhas de interceptação de voo do tipo Malaise com a parte superior em tecido escuro. As armadilhas foram posicionadas em campo com o frasco coletor contendo álcool etílico a 95% direcionado para o Norte, conforme protocolo (Lifeplan, 2022). As amostras foram coletadas semanalmente, e, seguindo o cronograma do projeto principal, foram realizadas amostragens ao longo de quatro anos, sendo dois anos dedicados para a FLONA de Nísia Floresta (2022 e 2024) e dois anos para o Parque Estadual das Dunas de Natal (2023 e 2025). Após as coletas, as amostras foram e armazenadas em laboratório sob refrigeração.

Uma vez recolhidas, as amostras foram submetidas à triagem, em que o material coletado foi devidamente separado e identificado taxonomicamente até o nível de ordem, com base na classificação adotada por Rafael, et al. (2024). Para auxiliar no processo inicial de triagem, foram utilizados microscópios estereoscópios Motic SMZ. Após a devida identificação, os espécimes foram separados e transferidos para tubos de centrífuga do tipo “falcon” e frascos eppendorf. Durante a triagem, contabilizou-se o número de espécimes por ordem, utilizando programas como Google Sheets e Microsoft Excel para tabular a composição de representantes de insetos para cada grupo taxonômico amostrado em cada semana. Além disso, foram plotados gráficos referentes à flutuação mensal do número geral de indivíduos e por Ordem para as duas localidades, bem como a média comparativa por coleta mensal (mC = ni/nC), onde “ni” representa o número de indivíduos coletados ao todo em cada mês, e “nC” representa o número de coletas realizadas no mês em questão. Também foram plotados gráficos da variação do número total de indivíduos coletados por ordem para cada localidade. Adicionalmente, foi calculada a abundância relativa, que representa a proporção de indivíduos de cada principal ordem em relação ao valor total de indivíduos para cada localidade, representada por pi = ni/N, onde “ni” representa o número de espécimes da ordem e “N” representa o valor total amostrado (Magurran, 2011).

Ao final da análise, todo o material coletado deve ser depositado na Coleção Entomológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, a Coleção Entomológica Adalberto Antônio Varela-Freire - Departamento de Microbiologia e Parasitologia (CE-AAVF - DMP/UFRN).

Resultados e Discussões

Ao todo, foram realizadas 81 coletas semanais em campo, sendo 34 coletas no período correspondente aos meses de maio a dezembro do ano de 2022 na

Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta, e 47 coletas semanais no período de fevereiro a dezembro de 2023 no Parque Estadual das Dunas de Natal. Entretanto, para esta análise, restringiu-se as amostras do Parque das Dunas coletadas a partir do mês de maio ao mês de dezembro de 2023, sendo, então, 32 amostras consideradas para esta localidade, totalizando 66 amostras consideradas neste estudo.

Ao final da amostragem, foram triados um total de 107590 indivíduos, sendo, destes, 46087 correspondentes às coletas realizadas no Parque das Dunas e 61503 à amostragem da FLONA de Nísia Floresta, distribuídos em 18 ordens de Insecta e alguns outros táxons, como Collembola, Arachnida, Isopoda e Anura. De maneira geral, pôde-se observar algumas diferenças na distribuição integral dos espécimes entre as duas localidades: no Parque Estadual das Dunas de Natal, as quatro ordens de Insecta mais representativas foram Diptera (com 26562 indivíduos), Hymenoptera (com 4333 indivíduos), Lepidoptera (com 1469 indivíduos) e Coleoptera (com 1329 indivíduos), respectivamente (figura 5). Já na FLONA, as quatro ordens mais abundantes foram Diptera (com 42282 indivíduos), Hymenoptera (com 3702 indivíduos), Lepidoptera (com 3321 indivíduos) e Hemiptera (com 2051 indivíduos), respectivamente (figura 6).

Observou-se diferenças no valor mensal de indivíduos coletados de ambas as localidades, com os meses mais representativos para o Parque das Dunas sendo setembro/2023, constituindo 22,57% do valor total (10402 indivíduos) e agosto/2023, representando 19,91% do valor total (9178 indivíduos) (tabela 1; figura 1). Para a FLONA de Nísia Floresta, os meses de maior abundância foram agosto/22, constituindo 21,52% da abundância total (13238 indivíduos), e julho/2022, correspondendo a 15,40% da abundância total (9476 indivíduos), de acordo com a tabela 2 e a figura 2. Além disso, ao observar a flutuação mensal de ambas as localidades (figuras 3 e 4), pôde-se inferir que Diptera praticamente determina as flutuações para o conjunto das ordens de Insecta. Parte disso, deve-se ao fato de Diptera estar entre as ordens megadiversas de insetos (Oliveira et al., 2013), sendo também apontada como o grupo mais abundante em diversos estudos utilizando armadilhas Malaise para amostragens desse tipo (Bordin; Sartor, 2016).

Outras ordens como Hymenoptera, Lepidoptera, Psocodea e Hemiptera diferiram quanto às suas flutuações mensais. É distinguível a curva de crescimento de Hymenoptera e Lepidoptera ao longo dos meses amostrados na FLONA do ano de 2022, do pico de abundância seguido de decrescimento dessas duas ordens na amostragem do Parque das Dunas em 2023 (figuras 7 e 8). Além disso, as ordens Hemiptera e Psocodea destacaram-se por serem mais abundantes que Coleoptera nas amostras da FLONA, contrastando com o Parque das Dunas, em que estas duas ordens não foram mais significativas do que Coleoptera. Este contraste é atípico para amostras de Malaise, e a ordem Coleoptera normalmente não é representativa nesse tipo de interceptação de voo. Isto indica que, a princípio, ao menos parte dos presentes resultados necessitam de revisão. Alguns outros táxons como Arachnida e Collembola tiveram flutuações semelhantes nas amostras do parque, com picos no início e meio do ano de 2023, sendo os meses de maio, agosto e setembro de 2023 mais significativos para aracnídeos, e maio, julho, agosto, setembro e outubro para

colêmbolos. Já na FLONA, desses dois táxons, Collembola foi mais relevante, tendo seu pico nos meses de agosto e dezembro. Embora ocorra em todas as amostras, Arachnida possui menor relevância nas curvas de amostragem, por ser menos abundante em comparação às demais.

Considerando o total de 22 táxons identificados nos dois locais, nota-se que ambos apresentaram grupos exclusivos. Dentre estes, 16 táxons ocorreram tanto na Floresta Nacional de Nísia Floresta quanto no Parque das Dunas de Natal. Dos 6 grupos restantes, 3 ocorreram exclusivamente na FLONA (Anura, Isopoda e Trichoptera) e 3 apenas no Parque das Dunas (Archaeognatha, Phasmatodea e Zygentoma). Outros táxons como Isopoda, Anura, Neuroptera, Phasmatodea, Blattodea, Dermaptera, Zygentoma, Mantodea, Archaeognatha, Thysanoptera, Embioptera e Trichoptera não tiveram presença nem influência significativa nas flutuações observadas, embora definam diferenças entre os dois locais de estudo e tenham aparecido esporadicamente nas amostras coletadas.

Conclusão

O presente trabalho representa uma contribuição inicial para o conhecimento da entomofauna do estado do Rio Grande do Norte e sobre a influência que a urbanização exerce sobre ecossistemas naturais como a Mata Atlântica, a partir das diferenças nos perfis da entomofauna de áreas com diferentes níveis de conservação, oferecendo um panorama da ocorrência de diversos táxons no Parque Estadual das Dunas de Natal e na Floresta Nacional (FLONA) de Nísia Floresta. Ao observar os padrões de flutuação, obteve-se o resultado esperado com a melhor amostragem de ordens como Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera nos dois locais, indicando a eficácia das armadilhas Malaise na captura de insetos de vôo ativo. Os meses melhor amostrados foram agosto de 2022 e setembro de 2023. Destaca-se também a ocorrência de táxons exclusivos nas duas áreas, sendo importantes dados de referência para diferenciação dos locais, embora a ausência de um determinado táxon nas amostras não indique necessariamente sua ausência no local em questão. Contudo, é necessário dar continuidade ao estudo, adicionando dados dos demais anos de 2024 e 2025 para uma caracterização mais precisa e dados mais sólidos, bem como melhores padrões de flutuação dos táxons em questão.

Além disso, é clara a necessidade de realizar coletas utilizando diferentes métodos de captura, a fim de melhor amostrar a diversidade e abundância de insetos habitantes de solo (como Blattodea, Orthoptera ou Zygentoma) ou insetos de vôo mais lento (Coleoptera), assim como a realização de estudos em diferentes estratos de vegetação, que podem apresentar padrões distintos de ocorrência de fauna (Amorim et al., 2022). Entretanto, este trabalho apresenta uma comparação entre perfis de entomofauna de locais sujeitos a diferentes níveis de influência urbana e preservação, o Parque Estadual das Dunas de Natal e a Floresta Nacional de Nísia Floresta, contribuindo para a melhor caracterização da entomofauna do Rio Grande do Norte e para a construção de conhecimentos importantes acerca da influência da ação antrópica nos

ecossistemas naturais, que podem ser usados no eventual manejo e conservação das espécies e ambientes estudados.

Referências

AMORIM, Dalton de Souza et al. Vertical stratification of insect abundance and species richness in an Amazonian tropical forest. Scientific Reports, v. 12, n. 1, p. 1734, 2 fev. 2022.

BORDIN, Daliana; SARTOR, Vitor. Diversidade e abundância da entomofauna em 3 estações do ano no Campus da Universidade do Contestado – UnC, Distrito de Marcílio Dias, Santa Catarina. Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar, v. 5, n. 1, p. 89–104, 18 ago. 2016.

CAMARGO, Amabílio José Aires de et al. Coleções entomológicas: legislação brasileira, coleta, curadoria e taxonomia para as principais ordens. Brasília, D.F.: Embrapa Cerrados, 2015.

HALLMANN, Caspar A. et al. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. PLOS ONE, v. 12, n. 10, p. e0185809, 18 out. 2017.

KARLSSON, Dave et al. The Swedish Malaise Trap Project: A 15 Year Retrospective on a Countrywide Insect Inventory. Biodiversity Data Journal, v. 8, p. e47255, 21 jan. 2020.

LIFEPLAN. LIFEPLAN, a planetary inventory of life. Disponível em: <https://www.helsinki.fi/en/projects/lifeplan/about>. Acesso em: 27 ago. 2026.

LIMA, Rodrigo Lucas et al. Riqueza de Famílias e Hábitos Alimentares em Coleoptera Capturados na Fazenda da EMPARN– Jiqui, Parnamirim / RN. EntomoBrasilis, v. 3, n. 1, p. 11–15, 23 abr. 2010.

MCKNIGHT, Tom L. (Tom Lee); HESS, Darrel. Physical geography : a landscape appreciation. [S.l.]: Upper Saddle River, N.J. : Prentice Hall, 2000.

OLIVEIRA, Ioleide Bispo Ribeiro et al. Diversidade da entomofauna em uma área de Caatinga no município de Bom Jesus-PI, Brasil. Científica, v. 41, n. 2, p. 150–155, 29 out. 2013.

THOMAZINI, Marcílio José; THOMAZINI, Ariane Paes de Barros Werckmeister. Levantamento de insetos e análise entomofaunística em floresta, capoeira e pastagem no Sudeste Acreano. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 35, n. 1, 2002.

UHLER, Johannes et al. A comparison of different Malaise trap types. Insect Conservation and Diversity, v. 15, n. 6, p. 666–672, 2022.

WAGNER, D. L., Insect Declines in the Anthropocene. Annual Review of Entomology, v.65, p.457-480, 2020.

WAGNER, D. L., et al. Insect Declines in the Anthropocene: Death by a thousand cuts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.118 No. 2, p.1-10, 2021.

Anexos



Figura 1 - Gráfico contendo a variação do número de indivíduos coletados por mês (PDD)



Figura 2 - Gráfico contendo a variação do número de indivíduos coletados por mês (FLONA)



Figura 3 - Gráfico contendo a variação mensal do No. de indivíduos por ordem de Insecta (PDD)



Figura 4 - Gráfico contendo a variação mensal do No. de indivíduos por ordem de Insecta (FLONA)



Tabela 1 - Dados de coletas mensais com número total de indivíduos por mês, número de coletas, média de indivíduos por coleta e porcentagem do valor do mês em relação ao valor total (PDD)



Tabela 2 - Dados de coletas mensais com número total de indivíduos por mês, número de coletas, média de indivíduos por coleta e porcentagem do valor do mês em relação ao valor total (FLONA)



Figura 5 - Gráfico contendo a variação do No. de indivíduos por ordem de Insecta (PDD)



Figura 6 - Gráfico contendo a variação do No. de indivíduos por ordem de Insecta (FLONA)



Figura 7 - Gráfico com flutuação mensal sem Diptera com as ordens de Insecta (PDD)



Figura 8 - Gráfico com flutuação mensal sem Diptera com as ordens de Insecta (FLONA)

CÓDIGO: SB1302

AUTOR: DIOGO HIESY TAVARES DANTAS

ORIENTADOR: ALIANDA MAIRA CORNELIO DA SILVA

TÍTULO: ESCLEROSE MÚLTIPLA: INVESTIGAÇÃO SOBRE AS DIFERENTES ETIOLOGIAS REFERENCIADAS NA LITERATURA

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória e neurodegenerativa, caracterizada pela destruição da bainha de mielina. Afeta jovens adultos, gerando alta morbidade e prejuízo à qualidade de vida. Sua patogênese permanece incerta, mas sabe-se que é multifatorial. Esta pesquisa objetiva analisar a literatura para verificar possíveis fatores etiologicos da EM, iniciando pela exploração da influência endócrina. Adotou-se uma revisão narrativa nas bases PubMed, Scopus e Web of Science. A seleção ocorreu por títulos e resumos, incluindo estudos sobre etiologia da EM, categorizados em relação aos hormônios/classes hormonais e os seus efeitos na EM. Embora a etiologia seja multifatorial, a análise aprofundou os fatores hormonais pela sua atuação na modulação inflamatória e incidência da doença. Os achados indicam papel crucial de andrógenos, melatonina, a vitamina D, os agonistas do receptor de GLP-1, o IGF-1 e fatores genéticos sexo-específicos como o CD99 na fisiopatologia da EM. Destaca-se a testosterona na imunomodulação, cuja inibição piora a progressão. Compreender tais mecanismos é essencial para terapias e manejo mais direcionado.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Hormônios. Testosterona. Fatores etiológico

TITLE: MULTIPLE SCLEROSIS: INVESTIGATION INTO THE DIFFERENT ETIOLOGIES CITED IN THE LITERATURE

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, and neurodegenerative disease characterized by the destruction of the myelin sheath. It affects young adults, leading to high morbidity and impaired quality of life. Its pathogenesis remains uncertain, though it is known to be multifactorial. This study aims to analyze the literature to identify potential etiological factors of MS, beginning with an exploration of endocrine influences. A narrative review was conducted using the PubMed, Scopus,

and Web of Science databases. Selection was based on titles and abstracts, including studies on MS etiology categorized by hormones or hormone classes and their effects on the disease. Although the etiology is multifactorial, the analysis focused on hormonal factors due to their role in inflammatory modulation and disease incidence. Findings indicate that androgens, melatonin, vitamin D, GLP-1 receptor agonists, IGF-1, and sex-specific genetic factors—such as CD99—play crucial roles in the pathophysiology of MS. Testosterone stands out for its role in immunomodulation, as its inhibition worsens disease progression. Understanding these mechanisms is essential for developing more targeted therapies and management strategies.

Keywords: Multiple Sclerosis. Hormones. Testosterone. Etiological factors.

Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória, neurodegenerativa e crônica que afeta o sistema nervoso central (SNC), incluindo o encéfalo e a medula espinal. Ela ocorre quando o sistema imunológico ataca a bainha de mielina e provoca interrupções na comunicação entre o encéfalo e o resto do corpo (Lakin et al., 2021). Considera-se que “as células T reconhecem autoantígenos específicos do SNC e infiltram-se” atacando a bainha de mielina, deixando-a danificada ou destruída em áreas específicas do sistema nervoso, além de promover falhas na remielinização, o que leva a lesões ou placas , formando cicatrizes gliais e transecções de axônios, atrofia em áreas da substância branca e cinzenta aparentemente normais (Goverman, 2009).

Em todo mundo são aproximadamente 2,8 milhões de pessoas com esclerose múltipla, sendo as manifestações clínicas presentes principalmente em adultos jovens, em torno de 20 a 30 anos de idade (Woo, 2024, p. 494). O Comitê Consultivo Internacional sobre Ensaios Clínicos em EM categorizou descritores de curso clínico, conhecido como classificação de Lublin-Reingold em 1996, com revisão em 2013, definindo três classificações para Esclerose Múltipla.

Os sintomas da EM estão relacionados com a localização e a gravidade das lesões que podem ser imperceptíveis por meses ou até anos (Hauser; Cree, 2020). Os sintomas mais comuns são: perda sensorial ou parestesias (formigamento), perda visual dolorosa unilateral (neurite óptica), fraqueza dos membros (hiperreflexia, sinal de Babinski), fraqueza facial semelhante à paralisia de Bell, visão turva devido à diplopia, ataxia, vertigem, sintomas paroxísticos, sintoma de Lhermitte (sensações semelhantes a choques elétricos provocadas pela flexão do pescoço), neuralgia do trigêmeo, espasmo hemifacial e neuralgia do glossofaríngeo, mioquimia facial (contrações rápidas e bruxuleantes dos músculos faciais), sensibilidade ao calor, disfunção da bexiga, dor, disfunção cognitiva, geralmente leve, conhecido como névoa cerebral, dificuldade em realizar multitarefas, disfunção sexual, fadiga (Hauser; Cree, 2020).

Embora a literatura científica já tenha identificado diversas etiologias potenciais, ainda há lacunas na compreensão de como esses fatores interagem para desencadear e influenciar o curso da doença. Assim, revisar as hipóteses etiológicas e conectar as principais descobertas sobre a patogênese da EM é relevante para sintetizar e evidenciar o conhecimento existente sobre essa doença, especialmente os fatores endócrinos, dada a influência na modulação inflamatória. Desse modo, o objetivo deste estudo é compilar

e analisar, por meio de pesquisa narrativa, os principais achados sobre os fatores associados à patogênese da Esclerose Múltipla, com ênfase nos hormônios, podendo subsidiar futuros estudos acerca do manejo da doença e estratégias de prevenção.

Metodologia

Foi adotada a abordagem narrativa da literatura como método de estudo, conforme os estudos de Olejnik et al. (2024) e Haki et al. (2024). Foram seguidos os passos:

Desenho das Buscas e Seleção de Bases de Dados: As buscas tiveram início em outubro de 2025, realizadas nas principais bases de dados em ciências médicas e biológicas: Scopus, PubMed e Web Of Science. O delineamento da pesquisa foi baseado em buscar elucidar o papel hormonal na etiologia da Esclerose Múltipla.

Estratégia de Busca: Os descritores foram combinados a partir do uso dos operadores booleanos “AND” e “OR” resultado na fórmula de busca:

("Multiple Sclerosis" OR "Sclerosis, Multiple" OR "Esclerose Múltipla" OR "MS disease") AND ("Hormones" OR "Endocrine System" OR "Sex Hormones" OR estrogen* OR progesterone OR testosterone OR cortisol OR prolactin OR "thyroid hormone*" OR "hormonal regulation" OR "endocrine factors") AND ("Pathogenesis" OR "Etiology" OR pathogenesis OR "disease mechanism*" OR "neuroinflammation" OR "immune response" OR "autoimmunity" OR "demyelination" OR "neurodegeneration").

Critérios de seleção:

Os dados recuperados nas bases de dados foram inseridos na plataforma Rayyan, seguido da identificação e exclusão dos estudos duplicados. Seguiu-se, então, para a triagem dos títulos e resumos, foram aplicados critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: (1) estudos indexados nas bases PubMed, Web of Science e/ou Scopus; (2) estudos que apresentassem os termos de busca previamente definidos no título e/ ou resumo; (3) estudos publicados em inglês e (4) estudos publicados nos últimos 10 anos, que tratassem da ação de hormônios relacionados à etiologia da esclerose múltipla. Os critérios de exclusão foram: (1) publicações na forma de capítulos de livros, teses dissertações, artigos de revisão e epidemiológicos e resumos de congressos; (2) estudos que não abordassem a ação de hormônios relacionados à etiologia da esclerose múltipla (3) artigos que não estivessem disponíveis em texto completo ou que não fossem publicados em inglês.

Compilação, Tabulação de Dados e Redação da Revisão: Os estudos selecionados foram compilados e tabulados para extração de informações relevantes (autor, ano; hormônio estudado; população estudada e principais métodos; principais achados correlacionando fatores endócrinos na modulação da Esclerose Múltipla), utilizadas na redação do manuscrito final. A estrutura da revisão segue uma organização por tópicos, em

conformidade com a pesquisa de Lakin e colaboradores (2021), que foi usada como modelo para a redação final.

Resultados e Discussões

Observaram-se 1.160 achados na PubMed; 1.672 arquivos na Scopus e 728 arquivos na Web of Science. Desses, foram pré-selecionados os artigos publicados nos últimos 10 anos, resultando em 412 arquivos da PubMed; 635 arquivos na Scopus e 303 indexados na Web of Science. Esses achados foram inseridos na plataforma Rayyan, para a exclusão de artigos duplicados, deletando 374 obras.

Então, seguiu-se para a leitura dos títulos e resumos dos 976 estudos, incluindo os artigos que contivessem alguns dos termos-chave listados anteriormente. Desses, apenas 79 artigos foram identificados com abordagens sobre hormônios e a etiologia da esclerose múltipla, assim, foram estudados para traçar a influência hormonal na patogênese da EM. As evidências preliminares dos estudos, estão compiladas na tabela 1.

Tabela 1. Principais evidências sobre fatores endócrinos na modulação da Esclerose Múltipla.

Os andrógenos, como a testosterona e seus derivados, têm sido implicados na modulação da resposta imune e nos processos de reparo da mielina na Esclerose Múltipla (EM). A análise dos mecanismos neuroprotetores dos andrógenos revela uma atuação que abrange desde a modulação da resposta inflamatória até o estímulo direto à oligodendrogênese. Em modelos de desmielinização induzida por brometo de etídio, o androstenediol (ADIOL) demonstrou propriedades promielinizantes, caracterizadas pela redução das lesões e pelo aumento tanto da densidade de neurofilamentos quanto da população de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) (Kalakh; Mouihate, 2015). Este efeito é acompanhado por uma redução da axonopatia, evidenciada pela menor presença de esferoides axonais, que são dilatações axonais arredondadas, contendo proteínas, membranas, mitocôndrias, neurofilamentos e outras organelas acumuladas sendo um sinal de neurodegeneração (WIRTHS et al., 2007); e por uma mudança na polarização microglial, que transita do fenótipo pró-inflamatório M1 (iNOS+) para o reparador M2 (arginase-1+) durante a fase aguda da lesão (Kalakh; Mouihate, 2017).

Os astrócitos, de forma complementar às micróglias, atuam como reguladores-chave da homeostase do Sistema Nervoso Central (SNC) sob influência androgênica. Estudos in vitro indicam que a testosterona, via ativação do receptor de andrógeno (RA), suprime a secreção da quimiocina pró-inflamatória CXCL1 em astrócitos estimulados por agentes desmielinizantes (Turniak-Kusy et al., 2024). Essa supressão é fundamental para limitar o recrutamento excessivo de neutrófilos e macrófagos, mitigando a neuroinflamação. Embora em contextos patológicos distintos, como nos gliomas, a testosterona possa elevar marcadores inflamatórios, no cenário da desmielinização seu papel é predominantemente neuroprotetor (Kanwore et al., 2023).

Com base nos dados avaliados, infere-se que a remielinização depende de uma sinergia entre a sinalização androgênica e a via CXCR4/CXCL12 nos astrócitos. Evidências em modelos murinos mostram que a testosterona regula positivamente a expressão de CXCR4, promovendo o recrutamento de oligodendrócitos (Olig2+/CaC1+) ao longo dos prolongamentos astrocíticos (Asbelaoui et al., 2024). Nesse processo, os prolongamentos dos astrócitos reativos atuam como suporte físico e quimiotático, guiando a migração dessas células até a área lesionada. Uma vez recrutados e maduros no local do dano, esses oligodendrócitos desprendem-se do arcabouço astrocítico para projetar suas membranas e envolver os axônios neuronais (Patel et al., 2010; Ghoumari; Schumacher, 2026).

A interdependência dessa via é confirmada pelo fato de que a castração, a inibição farmacológica do CXCR4 (via AMD3100) ou a ablação genética do RA em astrócitos bloqueiam a recuperação da mielina (MBP+), permitindo a invasão indesejada de células de Schwann (MPZ+) (Sherafat et al., 2011). Mesmo as células de Schwann pertencerem ao sistema nervoso periférico, em condições patológicas, como mencionado, podem invadir o SNC e contribuir para a remielinização, como um mecanismo de reparo cicatricial (Itoyama et al., 1983; Garcia-Diaz et al., 2019; Duncan; Hoffman, 2002). Notavelmente, a presença de astrócitos expressando RA e CXCR4 ao redor de lesões em pacientes com Esclerose Múltipla (EM) sugere que este mecanismo de suporte à remielinização central é conservado em humanos (Asbelaoui et al., 2024).

Além disso, o potencial terapêutico dos andrógenos transcende as distinções de sexo. O tratamento com diidrotestosterona (DHT) em modelos de EAE e cuprizona demonstrou promover a remielinização de forma eficaz tanto em machos quanto em fêmeas (Zahaf et al., 2023). Análises transcriptômicas reforçam essa observação ao revelar que a modulação de genes associados à plasticidade sináptica, produção de BDNF e diferenciação de OPCs ocorre de maneira análoga em ambos os sexos, posicionando os andrógenos como moduladores potentes da regeneração neural (VERHOVSHEK; RUDOLPH; SENGELAUB, 2013; VONDRAN et al., 2011; BRAMBLE et al., 2016).

No cenário clínico, as evidências corroboram a correlação entre a deficiência androgênica e a gravidade da EM; em pacientes do sexo feminino com a forma remitente-recorrente, níveis séricos reduzidos de testosterona associam-se a um maior volume de lesões com realce por gadolínio e a escores de incapacidade clínica mais elevados. Por outro lado, concentrações mais altas do hormônio exercem um papel protetor contra o dano tecidual, correlacionando-se com a preservação neuronal visível na ressonância magnética (TAVAKOL; SHAKIBAPOUR; BIDGOLI, 2016). No público masculino, ensaios clínicos indicam que o tratamento com gel de testosterona é seguro e capaz de melhorar o desempenho cognitivo e retardar a atrofia cerebral, sugerindo que o benefício androgênico pode estar mais estritamente ligado à neuroproteção da massa cinzenta do que a um efeito anti-inflamatório sistêmico imediato (SAKURAI et al., 2020; KURTH et al., 2014).

A relevância da homeostase hormonal é evidenciada, visto que homens com infertilidade por fator masculino, caracterizado por parâmetros seminais anormais, apresentam um risco significativamente maior de desenvolver EM, sugerindo uma vulnerabilidade biológica compartilhada entre a função testicular e a resiliência do sistema nervoso (GLAZER et al., 2017). Um achado contundente provém de estudos com indivíduos transgêneros, em que mulheres trans (designadas ao nascer como

homens) apresentaram um risco de desenvolver EM até seis vezes superior ao da população geral após a supressão de testosterona e introdução de estrogênios (PAKPOOR et al., 2016).

Entretanto, a interpretação dos níveis hormonais exige cautela. Embora o hipogonadismo hipogonadotrófico atinja cerca de 39% dos pacientes homens, observa-se frequentemente um desalinhamento entre os níveis séricos totais e a sintomatologia (DIACONU et al., 2022; JIANG et al., 2024). Essa discrepância pode ser explicada pela dinâmica da Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais (SHBG), que modula a fração biodisponível dos hormônios. Níveis baixos de SHBG, associados à resistência à insulina, reduzem a testosterona livre mesmo quando os níveis totais parecem normais. Assim, a testosterona livre e a razão testosterona/estradiol demonstram ser preditores mais fidedignos da incapacidade do que a testosterona total (QU; DONNELLY, 2020; SOUTEIRO et al., 2018).

Ademais, análises genômicas identificaram uma infraestrutura genética que liga os hormônios sexuais à suscetibilidade na EM, os níveis elevados de SHBG, determinados geneticamente, associam-se a um aumento de 63% no risco da doença (GENG; TANG, 2024). A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) pleiotrópicos e padrões de metilação no gene DES reforça que o risco de EM é influenciado por uma arquitetura genética que determina como o organismo regula a biodisponibilidade e a recepção dos sinais androgênicos ao longo da vida (QIU; ZHANG, 2025).

Para além dos eixos hormonais clássicos, a literatura revela um papel crescente de outros moduladores hormonais na patogênese e no tratamento da Esclerose Múltipla (EM). Como revelado na tabela 1, a melatonina, a vitamina D, os agonistas do receptor de GLP-1, o IGF-1 e até mesmo fatores genéticos sexo-específicos como o CD99 ampliam o espectro de influências endócrinas sobre a doença.

A melatonina é um hormônio indólico secretado principalmente pela glândula pineal e regulador do ritmo circadiano, destaca-se por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (MUÑOZ-JURADO et al., 2022). Pesquisas em modelo de desmielinização, induzida por cuprizona, demonstram que, na fase aguda, a melatonina exerce efeitos neuroprotetores em ambos os sexos, elevando níveis de enzimas antioxidantes e reduzindo marcadores inflamatórios como IL-1β e TNF-α, no entanto, na fase de remielinização, apenas machos mantêm o benefício, possivelmente porque o estrogênio endógeno nas fêmeas mascara o efeito adicional do hormônio (TALEB; ALGHAMDI, 2019).

Em pacientes com EM, o ritmo circadiano foi analisado pela quantificação da melatonina salivar. Observou-se que os níveis absolutos reduzidos correlacionam-se com maior duração da doença, fadiga acentuada e piora na qualidade do sono, além dos pacientes apresentarem maior vulnerabilidade pela manhã, já que os níveis do hormônio estavam abaixo do esperado (Kern et al., 2019). Nesse sentido, Yosefi-Fard e colaboradores (2019) pesquisaram os efeitos da suplementação de melatonina (3 mg/dia), revelando benefícios significativos, incluindo o aumento de INF-1β e a estabilização da Vitamina B12, fator crítico, pois sua deficiência exacerba a falha na manutenção da mielina e a degeneração axonal secundária (SAJI; LUI; JESUS, 2024). Tais indícios trazem à luz a melatonina, que se mantida a níveis ideais, reduzem a

progressão da EM, de modo a oferecer uma melhor qualidade de vida e maior autonomia aos pacientes acometidos.

Ademais, a Vitamina D, originalmente vista apenas como reguladora metabólica, é hoje reconhecida em sua forma ativa (calcitriol) como um potente imunomodulador. Receptores de vitamina D (VDR) estão presentes em diversas células do sistema imune, como linfócitos T, B e monócitos (PRIETL, B., et al., 2013). Investigação in vitro demonstra que o calcitriol aumenta a expressão de VDR e inibe citocinas pró-inflamatórias, como IL-17, IFN-γ, TNF-α, em ambos os sexos (Peruzzu et al., 2022). Contudo, observa-se uma resposta sexo-específica na produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, que apresenta aumento significativo apenas em células T de doadoras femininas (Peruzzu et al., 2022). Dado que as mulheres tendem a desenvolver respostas imunes inatas e adaptativas mais intensas (JAILLON et al., 2019), o calcitriol demonstra um potencial preventivo e terapêutico particularmente relevante para este grupo, sugerindo que mecanismos epigenéticos intrínsecos ao sexo modulam a eficácia da vitamina.

No campo das novas terapias, o NLY01, um agonista do receptor de GLP-1, tem se mostrado promissor em condições neurodegenerativas. Originalmente utilizado no tratamento do diabetes, esse agente possui propriedades que reduzem a conversão de astrócitos para o fenótipo neurotóxico A1 (STERLING et al., 2020). Em modelos de EAE, o NLY01 demonstrou capacidade de retardar o início e atenuar a gravidade da patologia ao suprimir a ativação de células imunes efetoras periféricas e impedir o seu tráfego para o SNC (Gharagozloo et al., 2021). Em virtude disto, o agonista do GLP-1 pode ser um potencial candidato a retardar a EM, já que posterga a patologia em estágios iniciais.

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) atua como um biomarcador de prognóstico crucial para sintomas específicos da EM. Embora seus níveis médios não diferenciam pacientes de controles saudáveis, baixas concentrações de IGF-1 estão fortemente correlacionadas à fadiga severa e ao comprometimento cognitivo (NAGEEB; HASHIM; FAWZY, 2018), reforçando seu papel na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica. Adicionalmente, a disparidade de gênero na EM pode ser influenciada por variações genéticas intrínsecas, como a expressão do gene CD99. Esta glicoproteína, envolvida na adesão de células T, apresenta expressão naturalmente maior em homens (WINSCHEL et al., 2024). A redução de CD99 em células T do líquido cefalorraquidiano de pacientes masculinos sugere que a perda deste marcador está associada à doença por mecanismos independentes da exposição hormonal, destacando que a vulnerabilidade à EM é um produto da interação entre o ambiente endócrino e a arquitetura genética celular.

Conclusão

Assim, esses dados revelam que a deficiência de andrógenos exacerba a ativação do sistema imune e compromete a função astrocítica de guiar o reparo via CXCR4, impedindo a maturação dos oligodendrócitos. Isso foi demonstrado a partir da integração dos mecanismos de polarização microglial M2 e a via astrocítica

CXCR4/CXCL12 às evidências em populações com hipogonadismo ou em transição hormonal. Isso reforça a hipótese, também, de que os andrógenos atuam como sinalizadores críticos para a manutenção e o reparo da mielina, sendo a biodisponibilidade androgênica um fator determinante para o risco e a progressão da EM. Futuras pesquisas poderiam explorar formas precoces de diagnóstico para arrefecer os sintomas e sua progressão, bem como aprimorar técnicas que sejam mais precisas na hora de identificar desde o útero ou após o nascimento.

DECLARAÇÃO DE USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Declaro que para a identificação dos estudos duplicados e triagem inicial dos títulos e resumos recuperados nas bases de dados foi utilizada a plataforma Rayyan. O recurso foi utilizado para otimizar o processo de seleção, sendo todas as decisões de inclusão e exclusão verificadas e validadas criticamente pelos revisores humanos responsáveis pelo estudo.

Referências

GOVERMAN J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. Nat Rev Immunol. 2009 Jun;9(6):393-407. doi: 10.1038/nri2550. PMID: 19444307; PMCID: PMC2813731.
Lakin L, et al. Comprehensive Approach to Management of Multiple Sclerosis: Addressing Invisible Symptoms-A Narrative Review. Neurol Ther. 2021 Jun;10(1):75-98. doi: 10.1007/s40120-021-00239-2. Epub 2021 Apr 20. PMID: 33877583; PMCID: PMC8057008.
Woo, M. S.; Engler, J. B.; Friese. M. A. FrieseThe neuropathobiology of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience | Volume 25 | July 2024 | 493–513.
Hauser, S. L.; Cree B. A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. Am J Med. 2020 Dec;133(12):1380-1390.e2. doi: 10.1016/j.amjmed.2020.05.049. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32682869; PMCID: PMC7704606.
ASBELAOUI, N. et al. Interplay between androgen and CXCR4 chemokine signaling in myelin repair. Acta Neuropathologica Communications, v. 12, n. 1, 30 jan. 2024. DOI: https://doi.org/10.1186/s40478-024-01730-1.
BRAMBLE, M. S. et al. Sex-specific effects of testosterone on the sexually dimorphic transcriptome and epigenome of embryonic neural stem/progenitor cells. Scientific Reports, v. 6, n. 1, 15 nov. 2016. DOI: https://doi.org/10.1038/srep36916.
DIACONU, C. et al. Hypogonadism in men with multiple sclerosis: prevalence and clinical associations. Multiple Sclerosis and Related Disorders, v. 59, p. 103508, mar. 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103508.
GENG, C.; TANG, Y. Association between levels of sex hormones and risk of multiple sclerosis: a Mendelian randomization study. Acta Neurologica Belgica, v. 124, n. 6, p. 1913–1922, 29 jul. 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/s13760-024-02613-x.
GHARAGOZLOO, M. et al. Therapeutic potential of a novel glucagon-like peptide-1 receptor agonist, NLY01, in experimental autoimmune encephalomyelitis. Neurotherapeutics, v. 18, n. 3, p. 1834–1848, jul. 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s13311-021-01088-5.
Glazer CH, Tøttenborg SS, Giwercman A, et al. Infertilidade por fator masculino e risco de esclerose múltipla: um estudo de coorte baseado em registro. Multiple Sclerosis

Journal . 2017;24(14):1835-1842. doi: 10.1177/1352458517734069
Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. Clin Rev Allergy Immunol. 2019 Jun;56(3):308-321. doi: 10.1007/s12016-017-8648-x. PMID: 28963611.
JIANG, Y. et al. Exploring the relationship between polycystic ovarian syndrome, testosterone, and multiple sclerosis in women: a nationwide cohort study and genome-wide cross-trait analysis. Multiple Sclerosis Journal, v. 30, n. 14, p. 1765–1774, 6 nov. 2024. DOI: https://doi.org/10.1177/13524585241292802.
Kalakh S, Mouihate A. The promyelinating properties of androstenediol in gliotoxin-induced demyelination in rat corpus callosum. Neuropathol Appl Neurobiol. 2015 Dec;41(7):964-82. doi: 10.1111/nan.12237. Epub 2015 May 30. PMID: 25786683.
KANWORE, K. et al. Testosterone upregulates glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and promotes neuroinflammation to enhance glioma cell survival and proliferation. Inflammation and Regeneration, v. 43, n. 1, 13 out. 2023. DOI: https://doi.org/10.1186/s41232-023-00300-7.
KERN, S. et al. Clinical relevance of circadian melatonin release in relapsing-remitting multiple sclerosis. Journal of Molecular Medicine, v. 97, n. 11, p. 1547–1555, 30 ago. 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s00109-019-01821-w.
KURTH, F. et al. Neuroprotective effects of testosterone treatment in men with multiple sclerosis. NeuroImage: Clinical, v. 4, p. 454–460, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nicl.2014.03.001.
MUÑOZ-JURADO, A. et al. Melatonin and multiple sclerosis: antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulator mechanism of action. Inflammopharmacology, v. 30, n. 5, p. 1569–1596, 2022.
PAKPOOR, J. et al. Gender identity disorders and multiple sclerosis risk: a national record-linkage study. Multiple Sclerosis Journal, v. 22, n. 13, p. 1759–1762, 11 jul. 2016. DOI: https://doi.org/10.1177/1352458515627205.
KALAKH, S.; MOUIHATE, A. Androstenediol Reduces Demyelination-Induced Axonopathy in the Rat Corpus Callosum: Impact on Microglial Polarization. Frontiers in Cellular Neuroscience, v. 11, 23 fev. 2017. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00049
NAGEEB, R. S.; HASHIM, N. A.; FAWZY, A. Serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in multiple sclerosis: relation to cognitive impairment and fatigue. The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery, v. 54, n. 1, 15 set. 2018. DOI: https://doi.org/10.1186/s41983-018-0026-y.
PERUZZU, D. et al. Anti-inflammatory effects of 1,25(OH)2D/calcitriol in T cell immunity: does sex make a difference? International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 16, p. 9164, 15 ago. 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms23169164.
PRIETL, B.; TREIBER, G.; PIEBER, T. R.; AMREIN, K. Vitamin D and immune function. Nutrients, v. 5, n. 7, p. 2502–2521, 5 jul. 2013. DOI: https://doi.org/10.3390/nu5072502.
OLEJNIK, P. et al. Multiple sclerosis: a narrative overview of current pharmacotherapies and emerging treatment prospects. Pharmacological Reports, v. 76, n. 5, p. 926–943, 23 ago. 2024. https://doi.org/10.1007/s43440-024-00642-0
HAKI, M. et al. Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. Medicine, v. 103, n. 8, p. e37297, 23 fev. 2024. https://doi.org/10.1097/md.0000000000037297
SAJI, A. M.; LUI, F.; JESUS, O. D. Spinal cord subacute combined degeneration. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2026. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560728/. Acesso em: 25 mar. 2026.
SAKURAI, K. et al. Severe multiple sclerosis manifesting upon GnRH agonist therapy

for uterine fibroids. Internal Medicine, v. 59, n. 23, p. 3093–3096, 1 dez. 2020. DOI: https://doi.org/10.2169/internalmedicine.4839-20.
SHERAFAT, M. A. et al. Castration attenuates myelin repair following lysolecithin induced demyelination in rat optic chiasm: an evaluation using visual evoked potential, marker genes expression and myelin staining. Neurochemical Research, v. 36, n. 10, p. 1887–1895, 28 maio 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/s11064-011-0510-6.
STERLING, J. K. et al. GLP-1 receptor agonist NLY01 reduces retinal inflammation and neuron death secondary to ocular hypertension. Cell Reports, v. 33, n. 5, p. 108271, 3 nov. 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108271.
TALEB, H. A.; ALGHAMDI, B. S. Neuroprotective effects of melatonin during demyelination and remyelination stages in a mouse model of multiple sclerosis. Journal of Molecular Neuroscience, v. 70, n. 3, p. 386–402, 11 nov. 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s12031-019-01425-6.
TAVAKOL, S.; SHAKIBAPOUR, S.; BIDGOLI, S. A. The level of testosterone, vitamin D, and irregular menstruation more important than omega-3 in non-symptomatic women will define the fate of multiple scleroses in future. Molecular Neurobiology, v. 55, n. 1, p. 462–469, 13 dez. 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/s12035-016-0325-1.
TURNIAK-KUSY, M. et al. Testosterone inhibits secretion of the pro-inflammatory chemokine CXCL1 from astrocytes. Current Issues in Molecular Biology, v. 46, n. 3, p. 2105–2118, 6 mar. 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/cimb46030135.
VERHOVSHEK, T.; RUDOLPH, L. M.; SENGELAUB, D. R. Brain-derived neurotrophic factor and androgen interactions in spinal neuromuscular systems. Neuroscience, v. 239, p. 103–114, jun. 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.028.
VONDRAN, M. W. et al. Levels of BDNF impact oligodendrocyte lineage cells following a cuprizone lesion. The Journal of Neuroscience, v. 31, n. 40, p. 14182–14190, 5 out. 2011. DOI: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6595-10.2011.
WINSCHEL, I. et al. Sex- and species-specific contribution of CD99 to T cell costimulation during multiple sclerosis. Biology of Sex Differences, v. 15, n. 1, 15 maio 2024. DOI: https://doi.org/10.1186/s13293-024-00618-y.

Anexos



Tabela 1. Principais evidências sobre fatores endócrinos na modulação da Esclerose Múltipla.

CÓDIGO: SB1305

AUTOR: MARIA ELOISE DA SILVA VIEIRA

ORIENTADOR: FERNANDO VAGNER LOBO LADD

TÍTULO: ALTERAÇÕES MORFOQUANTITATIVAS E COMPORTAMENTAIS NO HIPOCAMPO DE CALLITHRIX JACCHUS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL: RESULTADOS PRELIMINARES

Resumo

Introdução: O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico com papel central na na formação da memória e do aprendizado, tornando-se altamente vulnerável a quadros de estresse crônico e depressão. Em primatas não humanos, a privação do convívio social atua como um estressor capaz de induzir estados anedônicos e promover remodelações neuroestruturais marcantes. **Objetivo:** Analisar os efeitos do isolamento social frente ao convívio em grupo familiar no comportamento de ingestão de sacarose e na morfometria estereológica hipocampal em *Callithrix jacchus*. **Metodologia:** Avaliou-se o tempo de consumo de sacarose e alimento na Fase Basal (FB-D30) e na Fase Experimental (FE-D60 a FE-D127) em machos e fêmeas. A análise estereológica quantificou o Volume Total de Referência (Vref) e a população neuronal absoluta nas porções CA1, CA2/3 e Giro Denteado (GD). **Resultados:** Animais isolados apresentaram redução acentuada no tempo de ingestão a partir do D60 (47,75s em machos e 14,75s em fêmeas no D127), confirmando a indução de anedonia. O Vref foi de 9,60mm³ no Grupo Família (GF) e 11,08mm³ no Grupo Isolado (GI). O GF exibiu maior população neuronal em CA1 ($15,24 \times 10^6$ vs $12,91 \times 10^6$ no GI), enquanto o GI registrou médias superiores em CA2/3 ($10,87 \times 10^6$) e GD ($20,53 \times 10^6$). **Conclusão:** O isolamento social induz comportamento do tipo anedônico e altera a citoarquitetura hipocampal de forma sub-regional específica.

Palavras-chave: Hipocampo,Isolamento social,Anedonia,Estereologia, Callithrix jacchus

TITLE: MORPHOQUANTITATIVE AND BEHAVIORAL CHANGES IN THE HIPPOCAMPUS OF CALLITHRIX JACCHUS SUBMITTED TO SOCIAL ISOLATION: PRELIMINARY RESULTS

Abstract

The hippocampus is a limbic system structure with a central role in memory and emotional regulation, making it highly vulnerable to chronic stress and depression. In non-human primates, social deprivation acts as a stressor capable of inducing anhedonic states and promoting marked neurostructural remodeling. The aim of this study was to analyze the effects of social isolation compared to family group cohabitation on consummatory behavior (sucrose and food intake) and hippocampal stereological morphometry in Callithrix jacchus. To this end, consumption time was evaluated during the Baseline Phase (FB-D30) and the Experimental Phase (FE-D60 to FE-D127) in males and females. The stereological analysis quantified the Total Reference Volume (Vref) and the absolute neuronal population in the CA1, CA2/3, and Dentate Gyrus (DG) regions. As a result, isolated animals showed a sharp reduction in ingestion time starting from D60 (47.75 s in males and 14.75 s in females at D127), confirming the induction of anhedonia and hypophagia. The Vref was 9,60mm³ in the Family Group (FG) and 11,08mm³ in the Isolated Group (IG). The FG exhibited a higher neuronal population in CA1 (15,24 x 10^6 vs 12,91 x 10^6 in the IG), whereas the IG recorded higher averages in CA2/3 (10,87 x 10^6) and DG (20,53 x 10^6. Therefore, it is concluded that social isolation induces anhedonic-like behavior and alters hippocampal cytoarchitecture in a subregion-specific manner.

Keywords: Hippocampus,Social isolation,Anhedonia,Stereology, Callithrix jacchus

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) configura-se como uma das condições psiquiátricas mais prevalentes e incapacitantes globalmente, afetando cerca de 3,8% da população mundial, com destaque para a alta incidência em jovens e fêmeas (WHO, 2023). Nas Américas, o Brasil ocupa posição de destaque em número absoluto de casos, acometendo aproximadamente 5,8% da população (OPAS, 2020). A complexidade clínica do TDM se manifesta por episódios de alterações psíquicas, fisiológicas e comportamentais, incluindo anedonia, alterações do sono, desesperança e risco de suicídio (DSM-5, 2014). Embora a hipótese monoaminérgica tenha sustentado o desenvolvimento farmacológico clássico, a elevada taxa de refratariedade aponta uma etiologia multifatorial que extrapola o simples déficit de neurotransmissores (Jesulola et al., 2018).

O estresse crônico destaca-se como o principal fator precipitante para o TDM. A resposta mantida a estressores promove desregulação neuroendócrina por hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando na

liberação contínua e elevada de glicocorticóides (De Sousa et al., 2021). O cérebro de primatas apresenta regiões com alta sensibilidade a essa cascata hormonal, destacando-se o hipocampo por sua elevada densidade de receptores. O excesso de cortisol induz excitotoxicidade, redução do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e inibição da neurogênese adulta, levando à atrofia e perda da plasticidade neural (Bortolozzi et al., 2021).

Anatômica e filogeneticamente, o hipocampo é uma estrutura cortical primitiva classificada como arquicórtex, localizada na porção profunda do lobo temporal medial. Em conjunto com o Giro Denteado (GD), o Subículo e o córtex entorrinal, constitui a Formação Hipocampal (Andersen et al., 2007), a qual se divide histologicamente em sub-regiões distintas: CA1, CA2, CA3 e GD (Galvão-Coelho et al., 2017). O circuito intrínseco organiza-se de maneira trissináptica unidirecional: os eferentes do córtex entorrinal projetam-se via via perfurante para as células granulares do GD; estas enviam axônios (fibras musgosas) para os neurônios piramidais de CA3 que, por meio dos colaterais de Schaffer, conectam-se às células piramidais de CA1 (Galvão et al., 2021). Funcionalmente, a estrutura desempenha um papel central no processamento e consolidação das memórias declarativas (explícitas) e no mapeamento cognitivo espacial (Squire, 1992). Além disso, integra a rede de regulação da resposta ao estresse ao exercer controle inibitório (feedback negativo) sobre a alça neuroendócrina do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), influenciando indiretamente o processamento emocional em conjunto com o sistema límbico (; De Sousa et al., 2017)

Para investigar a fisiopatologia do TDM, o uso de primatas não humanos Neotropicais, especificamente o sagui de tufo branco (*Callithrix jacchus*), consolida-se como um modelo translacional robusto (Galvão-Coelho et al., 2017). Devido à proximidade filogenética, complexidade do repertório social e organização neuroanatômica semelhante à humana, o sagui permite a indução de estresse crônico por isolamento social.

Diante disso, o presente trabalho investiga os impactos do isolamento social sobre a integridade hipocampal e o comportamento de *Callithrix jacchus.* Especificamente, objetiva-se analisar os efeitos da privação social, em comparação ao convívio em grupo familiar, sobre a ingestão de sacarose, como indicador de anedonia, bem como mensurar as alterações morfoquantitativas nas sub-regiões do hipocampo.

Metodologia

2. METODOLOGIA

A presente pesquisa foi conduzida com 4 primatas não humanos da espécie *Callithrix jacchus* (machos e fêmeas juvenis, de 7 a 9 meses), oriundos do Núcleo de Primatologia da UFRN. Os animais foram mantidos sob condições naturais de iluminação e temperatura, com acompanhamento veterinário contínuo e em

conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (CEUA-UFRN). Para avaliar o impacto do suporte social, os sujeitos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos homogêneos (2 machos e 2 fêmeas cada): o Grupo Controle Familiar (GF, n=2), mantido em convivência contínua com seu grupo social por 120 dias, enquanto o Grupo Isolado (GI, n=2), foi induzido ao estresse crônico por isolamento social por 90 dias, privado de contato, recebendo salina nos mesmos intervalos até completar 120 dias de experimento.

O delineamento temporal compreendeu a Fase Basal (FB), de 30 dias (4 semanas), com os animais em ambiente familiar para registro de dados etológicos em dias alternados e estabelecimento da linha de base individual. Na Fase Experimental (FE), iniciou-se as observações comportamentais diárias nos 7 dias corridos da primeira semana de cada mês. A avaliação comportamental da anedonia e do perfil motivacional foi realizada pelo teste de ingestão de sacarose e ingestão de alimentos, mensurando-se o tempo total de consumo (em segundos) em ambos os sexos nos pontos D30, D60, D90, D120 e D127. Desse modo, vale salientar que as observações etológicas ocorreram durante 30 minutos diários, entre 07:00h e 08:00h, e foram conduzidas por divisórias de vidro com película unidirecional, registrando-se a frequência de comportamentos típicos da espécie (marcação de cheiro, e deslocamento) e a duração da ingestão alimentar, auto catação, piloereção, sono, e ato de coçar.

Ao término (D127), os animais foram eutanasiados por perfusão transcardíaca sequencial (salina 0,9%). Seções coronais seriadas de 40µm foram obtidas em criostato. A Série 1 foi corada com tionina (Técnica de Nissl) para evidenciação citoarquitetural. Enquanto as séries seguintes permaneceram sob crioproteção para análises complementares.

A análise estereológica não viesada do hipocampo foi realizada no sistema StereoInvestigator v11.0 acoplado a um microscópio Zeiss Axio Imager Z2, aplicando-se amostragem aleatória, uniforme e sistemática (SURS). O Volume Total de Referência (Vref) do hipocampo e das sub-regiões (CA1, CA2/3 e Giro Denteado) foi estimado pelo Princípio de Cavalieri. A população neuronal absoluta (Nissl+) foi quantificada pelo Optical Fractionator, o volume médio neuronal pelo Nucleator.

Resultados e Discussões

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. RESULTADOS

Durante a Fase Basal (FB – D30), os primatas de ambos os grupos e sexos apresentaram tempos consumatórios regulares e homogêneos, estabelecendo a linha de base do estudo. Com o início da Fase Experimental (FE – D60 a D127),

a submissão ao protocolo de isolamento social crônico provocou uma redução acentuada e sustentada no tempo de ingestão de solução de sacarose e de alimentos nos animais do Grupo Isolado (GI), enquanto os sujeitos mantidos no Grupo Família (GF) conservaram ou picos de engajamento consumatório.

No teste de ingestão de sacarose, os machos do GF elevaram seu tempo de consumo de 68,74s no D30 para o pico de 162,50s no D90, estabilizando em 100,00s no D127. Em contrapartida, os machos do GI sofreram uma queda expressiva logo no D60 28,75s, mantendo tempos reprimidos ao longo do período experimental e encerrando com 47,75s no D127. O perfil de supressão mostrou-se ainda mais pronunciado entre as fêmeas: enquanto as fêmeas do GF alcançaram 195,16s no D90 e finalizaram o estudo com 89,83s, as fêmeas isoladas declinaram progressivamente de 106,79s na fase basal (D30) para 33,81s no D60, atingindo uma marca residual de apenas 14,75s no D127.

O comportamento de ingestão alimentar exibiu dinâmica equivalente. Os machos do GF aumentaram o tempo dedicado ao consumo de 103,73s no D30 para 200,00s no D127. Por outro lado, os machos do GI reduziram a ingestão para 43,35s no D60, encerrando em 75,70s no D127. Nas fêmeas, o consumo de alimento no GF permaneceu elevado durante todo o acompanhamento, registrando 255,64s no D30 e 179,98s no D127. Em paralelo, as fêmeas do GI apresentaram retração imediata no D60 31,71s, mantendo-se em níveis hipofágicos até o término do estudo no D127 46,68s. Dentre todos os padrões etológicos monitorados, a redução nos parâmetros consumatórios destacou-se como a variação mais marcante, confirmando a indução de quadros anedônicos e hipofágicos decorrentes do estresse por separação social em Callithrix jacchus.

No âmbito neuroestrutural, a caracterização estereológica tridimensional revelou reorganizações volumétricas e citoarquiteturais sub-região específicas induzidas pelo isolamento socioambiental. O Volume Total de Referência (Vref) do hipocampo registrou uma discreta expansão no Grupo Isolado, apresentando média de 11,08mm³ no GI frente a 9,60mm³ no Grupo Família.

A análise da população neuronal absoluta (Nissl+) evidenciou respostas heterogêneas entre as sub-regiões hipocampais avaliadas. A área CA1 demonstrou alta suscetibilidade ao estresse, sofrendo uma retração com perda seletiva de 2.329.205 neurônios no grupo isolado (12.916.250 neurônios no GI vs. 15.245.455 no GF). Em direção oposta ao padrão regressivo de CA1, as demais regiões apresentaram incrementos numéricos nos animais submetidos ao isolamento: a sub-região CA2/3 exibiu um ganho de 1.040.114 neurônios (10.878.750 no GI vs. 9.838.636 no GF), enquanto o Giro Denteado (GD) registrou um aumento populacional de 2.508.068 neurônios (20.538.750 no GI vs. 18.030.682 no GF).

3.2. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam uma clara correlação entre a privação socioambiental crônica, a expressão de comportamentos indicativos de estresse crônico e a ocorrência de remodelações morfoquantitativas hipocampais sub-

região específicas em primatas não humanos (Callithrix jacchus) (Cacioppo & Hawkley, 2009; Cinini et al., 2014; Barros et al., 2008).

A acentuada diminuição das respostas consumatórias em fêmeas e machos isolados reflete o comprometimento funcional das vias de sinalização de recompensa e da modulação dopaminérgica e serotoninérgica que conectam a formação hipocampal ao estriado ventral e ao córtex pré-frontal (Grace, 2016; Haber & Knutson, 2010; Russo & Nestler, 2013). A resposta mais acentuada de supressão no sexo feminino em ambas as provas aponta para uma vulnerabilidade dimórfica e neuroendócrina do sexo feminino diante de estressores socioemocionais sustentados (Pryce et al., 2005; Galvão-Coelho et al., 2008).

A marcante supressão na preferência por sacarose e no tempo de ingestão alimentar no GI valida a eficácia do protocolo de separação como indutor de anedonia e hipofagia, sintomas cardinais do TDM (Willner, 1997; Pizzagalli, 2014; Galvão-Coelho et al., 2012). A diminuição das respostas consumatórias reflete o comprometimento das vias dopaminérgicas e serotonérgicas da via de recompensa (Grace, 2016; Russo & Nestler, 2013). A inibição mais pronunciada observada no sexo feminino corrobora a maior vulnerabilidade dimórfica e neuroendócrina das fêmeas frente a estressores socioemocionais (Pryce et al., 2005; Galvão-Coelho et al., 2008).

A retração e perda neuronal observada na região CA1 no grupo isolado, com uma diferença de 2,32 x 10^6 neurônios a menos quando comparado ao grupo familiar, alinha-se à literatura neurobiológica que aponta a vulnerabilidade seletiva das células piramidais de CA1 ao estresse crônico, à excitotoxicidade glutamatérgica e à desregulação de fatores neurotróficos como o BDNF (McEwen & Magarinos, 1997; Duman & Monteggia, 2006; Lucassen et al., 2014).

Por outro lado, os aumentos numéricos observados no Giro Denteado (GD) e na região CA2/3 no grupo isolado sugerem a atuação de mecanismos compensatórios complexos ou alterações dinâmicas na neurogênese adulta e no remodelamento estromal (Schoenfeld & Gould, 2012; Warner-Schmidt & Duman, 2006). O incremento na densidade neuronal do GD pode ser decorrente da proliferação reativa de progenitoras neurais na Zona Subgranular (SGZ) em resposta ao insulto estressante inicial, ou ainda de atrasos na maturação e poda sináptica (pruning) de novos neurônios induzidos pela alteração no microambiente neuroquímico (Gould et al., 1998; Lucassen et al., 2010; Kozorovitskiy & Gould, 2004). Adicionalmente, o ligeiro aumento no Volume Total de Referência (Vref) no grupo GI (11,08mm^3 vs 9,60mm^3 no GF) pode refletir processos de edema citotóxico, astrogliose reativa ou expansão da matriz extracelular secundária à resposta inflamatória induzida pelo estresse mantido (Czeh et al., 2006; Sanacora et al., 2012).

Em síntese, os dados corroboram que o suporte social atua como um fator neuroprotetor crucial contra as alterações anatômicas e comportamentais induzidas pelo estresse (Ozbay et al., 2007; Hostinar et al., 2014; Galvão-Coelho et al., 2012). A heterogeneidade das respostas observadas entre as sub-regiões hipocampais reforça a necessidade de análises morfoquantitativas

tridimensionais detalhadas e imunomarcações complementares para mapear com precisão os substratos neurobiológicos subjacentes aos quadros depressivos e subsidiar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas translacionais (Sousa et al., 2000; Duman et al., 2019).

Conclusão

4. CONCLUSÃO

O isolamento social crônico em primatas não humanos da espécie Callithrix jacchus consolida-se como um modelo translacional de elevado rigor metodológico e alta relevância para o estudo do Transtorno Depressivo Maior (TDM). A privação de contato social atua como um potente estressor socioemocional, capaz de deflagrar quadros comportamentais análogos à depressão humana em ambos os sexos.

No âmbito neurobiológico, os achados sugerem que a extrema vulnerabilidade do hipocampo ao estresse crônico decorre de sua alta densidade de receptores de glicocorticóides. Essa dinâmica neurotóxica reflete-se em alterações morfométricas hipocampais sub-região específicas. Destaca-se a perda neuronal acentuada na sub-região CA1, área altamente suscetível à retração dendrítica e à neurodegeneração induzida pelo estresse, enquanto as sub-regiões CA2/3 e o Giro Denteado exibem uma reorganização celular e volumétrica de caráter expansivo ou compensatório. Esses dados reforçam que o suporte social e a convivência familiar exercem um papel neuroprotetor indispensável para a manutenção da neuroplasticidade, da regulação do humor e da citoarquitetura hipocampal.

Por fim, como perspectiva de prosseguimento, pretende-se investigar o potencial modulador e neuroplástico da N,N-dimetiltriptamina (DMT), avaliando sua capacidade de reverter os danos citoarquiteturais observados, restaurar a integridade celular e reativar vias neurotróficas (como o BDNF) no combate aos efeitos do estresse crônico.

Referências

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Psychiatric Association. (2014). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. Artmed Editora.

Barros, M., Albeck, D., & Tomaz, C. (2008). Behavior and cortisol responses of marmoset monkeys (Callithrix jacchus) to stress and social separation. Hormones and Behavior, 53(2), 340-348.

Bortolozzi, A., Manashirov, S., Chen, A., & Artigas, F. (2021). Oligonucleotides as therapeutic tools for brain disorders: Focus on major depressive disorder and Parkinson's disease. Pharmacology & Therapeutics, 227, 107877.

Cacioppo, J. T., & Hawkley, L. C. (2009). Perceived social isolation and cognition. Trends in Cognitive Sciences, 13(10), 447-454.

Cinini, S. M., Barnabe, G. F., Galvão-Coelho, N. L., de Sousa, M. B. C., & Mello, L. E. (2014). Social isolation disrupts hippocampal neurogenesis and impairs memory in marmoset monkeys. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 8, 112.

Czého, B., Simon, M., Schmelting, B., Hiemke, C., & Fuchs, E. (2006). Astroglial plasticity in a nonhuman primate model of depression: effects of stress and antidepressant treatment. Neuropsychopharmacology, 31(8), 1616-1626.

De Sousa, M. B. C. et al. (2021). Neuroendocrinologia do estresse e regulação do eixo HPA em primatas Neotropicais. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 120, 105-118.

Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biological Psychiatry, 59(12), 1116-1127.

Duman, R. S., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2019). Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. Neuron, 102(1), 75-90.

Galvão-Coelho, N. L., Silva, H. P. A., & de Sousa, M. B. C. (2008). Resposta estressórica e comportamento em primatas não humanos sob isolamento. Revista Brasileira de Primatologia, 16(1), 45-52.

Galvão-Coelho, N. L., Silva, H. P. A., & de Sousa, M. B. C. (2012). Stress and social support in common marmosets (Callithrix jacchus). Stress, 15(4), 435-443.

Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(6), 3168-3171.

Grace, A. A. (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. Nature Reviews Neuroscience, 17(8), 524-532.

Haber, S. N., & Knutson, B. (2010). The reward circuit: linking primate anatomy and physiology. Neuropsychopharmacology, 35(1), 4-26.

Hostinar, C. E., Sullivan, R. M., & Gunnar, M. R. (2014). Psychobiological mechanisms underlying social buffering of the stress response as a function of development. Psychological Bulletin, 140(1), 256.

Jesulola, E., Mlynec, P., & Bob, P. (2018). Biological mechanisms of treatment-resistant depression. Journal of Affective Disorders, 237, 120-132.

Joëls, M., Karst, H., Krugers, H. J., & Lucassen, P. J. (2007). Chronic stress: implications for neuroplasticity and neural encoding. Current Opinion in Neurobiology, 17(2), 245-252.

Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2004). Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. Journal of Neuroscience, 24(29), 6755-6759.

Lucassen, P. J., Meerlo, P., Naylor, A. S., van Dam, A. M., Dayer, A. G., Fuchs, E., ... & Czeh, B. (2010). Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: chemical neuroplasticity in depression. Current Neuropharmacology, 8(1), 12-32.

Lucassen, P. J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O. F., Van Dam, A. M., Rajkowska, G., ... & Swaab, D. F. (2014). Neuropathology of stress. Acta Neuropathologica, 127(1), 109-135.

McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiological Reviews, 87(3), 873-904.

McEwen, B. S., & Magarinos, A. M. (1997). Stress effects on amygdala and hippocampus: structural plasticity and neural circuitry. Annals of the New York Academy of Sciences, 821(1), 271-284.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). (2020). Depressão nas Américas: Dados estatísticos e panorama epidemiológico. OPAS/OMS.

Ozbay, F., Johnson, D. C., Dimoulas, E., Morgan, C. A., Charney, D., & Southwick, S. (2007). Social support and resilience to stress: from basic neurobiology to clinical practice. Psychiatry (Edgmont), 4(5), 35.

Pariante, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. Trends in Neurosciences, 31(9), 464-468.

Pizzagalli, D. A. (2014). Depression, anhedonia, and the neural circuitry of reward. Current Opinion in Neurobiology, 28, 111-118.

Pryce, C. R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A. C., & Feldon, J. (2005). Early life stress in the marmoset monkey: effects on development of the HPA axis and behavior. Annals of the New York Academy of Sciences, 1032(1), 290-293.

Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. Nature Reviews Neuroscience, 14(9), 609-625.

Sanacora, G., Treccani, G., & Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. Neuropharmacology, 62(1), 63-77.

Sapolsky, R. M. (2000). Stress and Plasticity in the Limbic System. Neurobiology of Learning and Memory, 74(1), 60-65.

Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2012). Stress, adult neurogenesis, and neuroplasticity in the hippocampus. Neurobiology of Learning and Memory, 97(3), 280-291.

Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F., & Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization of the morphology in limbic structures upon stress: a stereological study. Neuroscience, 97(2), 253-266.

Warner-Schmidt, J. L., & Duman, R. S. (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. Hippocampus, 16(3), 239-249.

Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology, 134(4), 319-329.

World Health Organization (WHO). (2023). Depressive disorder (depression): Key facts. WHO Fact Sheets.

CÓDIGO: SB1320

AUTOR: ANDERSON GABRIEL DO NASCIMENTO CRUZ

ORIENTADOR: BRUNO LOBAO SOARES

TÍTULO: Efeitos profiláticos do fumarato de DMT sobre respostas comportamentais ao condicionamento aversivo em zebrafish adultos

Resumo

Situações aversivas geram respostas importantes para a adaptação, mas a exposição constante pode contribuir para alterações relacionadas ao medo e ao estresse. Este estudo investigou se a exposição profilática ao fumarato de N,N-dimetiltriptamina (DMT) poderia modificar as respostas de zebrafish adultos a um estímulo aversivo. 80 animais foram distribuídos em quatro grupos, conforme o tratamento, água do sistema ou fumarato de DMT, e a exposição ou não a choques elétricos. Antes do teste, os animais permaneceram por 40 minutos na solução correspondente. Em seguida, foram colocados individualmente em um tanque com padrão xadrez e receberam cinco choques breves ou permaneceram no aparato pelo mesmo período sem estimulação. Foram analisados distância total, velocidades média e máxima, tempo parado e distância do fundo. O choque aumentou o tempo parado nos animais controle, indicando maior imobilidade. Esse aumento não foi significativo nos animais tratados com DMT, que permaneceram menos tempo parados que os controles sob choque. O tratamento também aumentou a velocidade média, principalmente na ausência de choque, mas não alterou as demais medidas. Em conjunto, os resultados sugerem que a exposição profilática ao fumarato de DMT atenuou a imobilidade induzida pelo choque, embora novos estudos sejam necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: DMT. Zebrafish. Estresse. Ayahuasca. Condicionamento aversivo

TITLE: Prophylactic effects of DMT fumarate on behavioral responses to aversive conditioning in adult zebrafish

Abstract

Aversive situations trigger behavioral responses that are essential for adaptation, but persistent exposure may contribute to changes associated with fear and stress. This

study investigated whether prophylactic exposure to N,N-dimethyltryptamine (DMT) fumarate could modify the responses of adult zebrafish to an aversive stimulus. Eighty animals were divided into four groups according to treatment—system water or DMT fumarate—and exposure or non-exposure to electric shocks. Before testing, the animals remained in their assigned solution for 40 minutes. They were then placed individually in a checkerboard tank and received five brief electric shocks or remained in the apparatus for the same period without stimulation. Total distance, mean and maximum speed, stopped time, and distance from the bottom were analyzed. Shock increased stopped time in control animals, indicating greater immobility. This increase was not significant in DMT-treated animals, which remained stopped for less time than controls under shock. DMT also increased mean speed, mainly in the absence of shock, but did not affect the other measurements. Overall, prophylactic exposure to DMT fumarate attenuated shock-induced immobility, although further studies are needed to clarify the underlying mechanisms.

Keywords: DMT. Zebrafish. Stress. Ayahuasca. Aversive conditioning

Introdução

Os transtornos afetivos e relacionados ao estresse envolvem alterações na regulação emocional, na formação de memórias aversivas e nas respostas comportamentais diante de estímulos ameaçadores. A investigação de substâncias capazes de modular essas respostas pode contribuir para a compreensão de mecanismos relacionados ao medo e à adaptação ao estresse. Nesse contexto, compostos serotoninérgicos vêm recebendo atenção por seus possíveis efeitos sobre ansiedade, medo e plasticidade neural. A N,N-dimetiltriptamina (DMT) é uma triptamina endógena e um dos principais compostos psicoativos da ayahuasca. Sua ação farmacológica envolve receptores serotoninérgicos, especialmente 5-HT2A e 5-HT1A, e possível participação do receptor sigma-1 (FONTANILLA et al., 2009; CARBONARO; GATCH, 2016). Embora esses mecanismos sustentem hipóteses sobre modulação de respostas ao estresse, a avaliação comportamental controlada é necessária para caracterizar os efeitos da substância em condições aversivas. O zebrafish (Danio rerio) é um modelo translacional amplamente empregado em neurociência comportamental devido à conservação de sistemas neurotransmissores, à sensibilidade a fármacos administrados por imersão e à presença de respostas mensuráveis de medo e defesa (HOWE et al., 2013; KALUEFF et al., 2014). Em contextos aversivos, alterações de locomoção, proximidade do fundo e imobilidade podem ser utilizadas para descrever a resposta comportamental ao estímulo ameaçador (STEENBERGEN et al., 2011). O condicionamento contextual por choque elétrico já foi empregado para investigar memória e respostas defensivas nessa espécie (KENNEY et al., 2017). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos profiláticos do fumarato de DMT sobre respostas comportamentais de zebrafish adultos durante uma exposição contextual ao medo. Foram comparados animais tratados com água do sistema ou fumarato de DMT, submetidos ou não a choque elétrico, permitindo examinar os efeitos do tratamento, da condição contextual e da interação entre ambos.

Metodologia

Foram utilizados zebrafish adultos (Danio rerio), de ambos os sexos, com idade aproximada de 3 a 5 meses, provenientes de criadouro local. Os animais foram mantidos em sistema de recirculação com filtração biológica, ciclo claro-escuro de 14:10 h, temperatura de 27 ± 2 °C e pH entre 7,0 e 7,5, com alimentação composta por ração comercial e artêmia viva duas vezes ao dia e aclimatação ao laboratório por no mínimo sete dias. Foi adotado delineamento fatorial 2 × 2, considerando os fatores tratamento (água do sistema ou fumarato de DMT) e condição contextual (sem choque ou com choque). Foram formados quatro grupos: água/sem choque, água/com choque, DMT/sem choque e DMT/com choque, com n = 20 animais por grupo e N = 80 em todas as análises. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os quatro grupos experimentais. Cada animal foi transferido individualmente para recipiente contendo 1 L de água do sistema ou solução de fumarato de DMT, em concentração equivalente a 60,62 mg/L de DMT, por 40 minutos imediatamente antes da exposição contextual. Essa concentração foi definida a partir de testes de padronização realizados no laboratório, com ajuste da massa de acordo com o peso molecular do sal fumarato utilizado. A solução foi preparada antes da sessão, mantida em frasco âmbar e protegida de luz direta, com registro de temperatura e pH. A exposição contextual foi realizada em tanque de vidro de 15 × 15 × 15 cm, com paredes revestidas internamente por padrão xadrez de 2 × 2 cm e contendo 2 L de água do sistema. Duas grades de cobre paralelas foram posicionadas em lados opostos e conectadas a estimulador elétrico calibrado para 6 V DC. O animal permaneceu 60 segundos em aclimatação e, nos grupos com choque, foram aplicados cinco choques de 2 segundos com intervalos de 5 segundos. Nos grupos sem choque, o animal permaneceu no tanque pelo mesmo tempo total de 95 segundos, sem estímulo elétrico. Toda a sessão foi filmada. Antes da análise, os vídeos foram identificados apenas por códigos, mantendo o avaliador sem acesso à identificação direta dos grupos durante o processamento no ANY-maze. As gravações foram analisadas para obtenção da distância total percorrida, velocidade média, velocidade máxima, tempo parado e distância média do fundo do tanque. O tempo parado foi utilizado como medida de imobilidade comportamental, enquanto valores menores de distância do fundo indicaram maior proximidade da região inferior. Cada variável foi analisada por ANOVA de duas vias, com tratamento e condição contextual como fatores entre indivíduos. Quando apropriado, foram realizadas comparações simples com correção de Sidak para duas comparações dentro de cada família, adotando o nível de significância $p < 0,05$. A descrição experimental foi organizada, de acordo com as recomendações ARRIVE 2.0 (PERCIE DU SERT et al., 2020).

Resultados e Discussões

As análises incluíram 80 animais, distribuídos em quatro grupos de 20 animais. As estatísticas descritivas das cinco variáveis comportamentais estão apresentadas na Tabela 1. Não foram observados efeitos significativos do tratamento ($F(1,76) = 0,63$; $p = 0,429$), do choque ($F(1,76) = 1,85$; $p = 0,177$) ou da interação tratamento × choque ($F(1,76) = 0,51$; $p = 0,477$) sobre a distância total, e as comparações de Sidak também não mostraram diferenças entre condições ou tratamentos (p ajustado ≥ 0,271). Para a velocidade média, houve efeito principal do tratamento ($F(1,76) = 4,93$; $p = 0,029$), sem

efeito do choque ($F(1,76) = 1,29$; $p = 0,259$) ou interação ($F(1,76) = 1,28$; $p = 0,261$). Na condição sem choque, a velocidade média do grupo DMT foi 0,76 cm/s maior que a do controle (controle − DMT = −0,765 cm/s; p de Sidak = 0,040), enquanto sob choque não houve diferença entre os tratamentos (p de Sidak = 0,691). Como a interação não foi significativa, essa comparação simples foi interpretada como complementar ao efeito principal. A velocidade máxima não apresentou efeito do tratamento ($F(1,76) = 1,73$; $p = 0,192$), do choque ($F(1,76) = 1,87$; $p = 0,175$) ou da interação ($F(1,76) = 0,66$; $p = 0,419$), e todas as comparações de Sidak foram não significativas (p ajustado ≥ 0,239). Para o tempo parado, houve efeito principal do choque ($F(1,76) = 16,73$; $p < 0,001$) e interação tratamento × choque ($F(1,76) = 5,91$; $p = 0,017$), sem efeito principal do tratamento ($F(1,76) = 0,93$; $p = 0,337$). No grupo controle, o choque aumentou o tempo parado em 41,59 s em relação à condição sem choque (p de Sidak < 0,001), enquanto no grupo DMT a diferença de 10,57 s não foi significativa (p de Sidak = 0,429). Sob choque, o grupo controle permaneceu parado 21,66 s a mais que o grupo DMT (p de Sidak = 0,037), enquanto sem choque não houve diferença entre tratamentos (p de Sidak = 0,514). Não foram detectados efeitos do tratamento ($F(1,76) = 0,50$; $p = 0,483$), do choque ($F(1,76) = 0,54$; $p = 0,465$) ou da interação ($F(1,76) = 1,22$; $p = 0,272$) sobre a distância do fundo, e as comparações de Sidak foram igualmente não significativas (p ajustado ≥ 0,355). O achado mais consistente foi, portanto, a interação observada no tempo parado: o choque aumentou a imobilidade no controle, mas não no grupo previamente exposto ao fumarato de DMT, e os tratamentos diferiram especificamente sob choque. A ausência de diferenças na distância total e na velocidade máxima reduz a probabilidade de que esse efeito seja explicado apenas por comprometimento locomotor generalizado, embora a elevação da velocidade média associada ao tratamento indique que efeitos locomotores sutis devem ser considerados. A DMT atua principalmente em receptores serotoninérgicos e também foi descrita como reguladora do receptor sigma-1 (FONTANILLA et al., 2009; CARBONARO; GATCH, 2016), o que oferece indicativos para modulação comportamental, mas os dados analisados não permitem identificar o mecanismo responsável. Dessa forma, os resultados são compatíveis com redução da imobilidade induzida pelo choque, sem extrapolação direta para efeito ansiolítico, antidepressivo ou terapêutico. A interpretação é limitada pela ausência de grupo contendo apenas ácido fumárico, pelo uso de animais de ambos os sexos sem análise estratificada e pela realização dos grupos em dias distintos.

Conclusão

A exposição profilática ao fumarato de DMT modulou a resposta comportamental ao condicionamento aversivo. O choque aumentou o tempo parado nos animais controle, enquanto esse aumento não foi significativo nos animais tratados com DMT. Quando exposto ao choque, o grupo DMT permaneceu parado por tempo significativamente menor que o controle, sustentando uma diminuição da imobilidade induzida pelo estímulo aversivo. O tratamento também aumentou a velocidade média, principalmente na condição sem choque, mas não alterou a distância total, a velocidade máxima ou a distância do fundo. Assim, o efeito sobre o tempo parado não parece decorrer de comprometimento locomotor global. Os resultados são compatíveis com modulação profilática da resposta de imobilidade pelo fumarato de DMT nas condições avaliadas. Esses resultados, porém, ainda não permitem explicar como esse efeito ocorre no

organismo. Estudos futuros deverão incluir o grupo controle do contra-íon fumarato, balanceamento entre dias, estratificação por sexo, documentação de perdas e replicação independente.

Referências

CARBONARO, T. M.; GATCH, M. B. Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. Brain Research Bulletin, v. 126, pt. 1, p. 74–88, 2016. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.016.

FONTANILLA, D. et al. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. Science, v. 323, n. 5916, p. 934–937, 2009. DOI: 10.1126/science.1166127.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, v. 496, p. 498–503, 2013. DOI: 10.1038/nature12111.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. Trends in Pharmacological Sciences, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014. DOI: 10.1016/j.tips.2013.12.002.

KENNEY, J. W. et al. Contextual fear conditioning in zebrafish. Learning & Memory, v. 24, n. 10, p. 516–523, 2017. DOI: 10.1101/lm.044818.117.

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. PLoS Biology, v. 18, n. 7, e3000410, 2020. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.

STEENBERGEN, P. J.; RICHARDSON, M. K.; Cchampagne, D. L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. Behavioural Brain Research, v. 222, n. 1, p. 15–25, 2011. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.025.

Anexos



Figura 1 – Distância total percorrida (cm). Controle vs. DMT, Sem/Com choque (n = 20/grupo). Sem diferenças significativas (p > 0,05).



Figura 2 – Tempo parado (s). Controle vs. DMT, Sem/Com choque (n = 20/grupo). Choque aumentou o tempo parado apenas no Controle (**p < 0,0001); DMT vs. Controle marginal no grupo Com choque (#p = 0,037).



Figura 3 – Velocidade máxima (cm/s). Controle vs. DMT, Sem/Com choque (n = 20/grupo). Sem diferenças significativas (p > 0,05).



Figura 4 – Velocidade média (cm/s). Controle vs. DMT, Sem/Com choque (n = 20/grupo). DMT marginalmente maior que Controle na condição Sem choque (#p = 0,040).



Figura 5 – Distância do fundo (cm). Controle vs. DMT, Sem/Com choque (n = 20/grupo). Sem diferenças significativas (p > 0,05).

CÓDIGO: SB1325

AUTOR: PEDRO VÍTOR CARVALHO FERREIRA DA SILVA

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

COAUTOR: MARIA ELOISA GOMES TEIXEIRA PEIXOTO

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Diversidade, distribuição e interações tritróficas de Braconidae (Hymenoptera) associados a moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Rio Grande do Norte

Resumo

A família Braconidae desempenha papel fundamental no controle biológico de moscas-das-frutas, porém informações sobre sua diversidade no Rio Grande do Norte ainda são dispersas. Este trabalho objetivou levantar ocorrência, diversidade e associações tritróficas desses parasitoides em frutos e localidades do estado, abrangendo décadas de coletas. O estudo baseou-se em amostragens do Laboratório de Moscas-das-Frutas da UFRN entre 2000 e 2026. Foram registrados 1.255 espécimes de Braconidae, pertencentes a três espécies: *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911), amplamente predominante; *Opius bellus* Gahan, 1930; e *Asobara anastrephae* (Muesebeck, 1958). As vespas emergiram de pupários de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), *Anastrepha sororcula* Zucchi, 1979, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), *Anastrepha zenildae* Zucchi, 1979, *Anastrepha serpentina* (Wiedemann, 1830), *Anastrepha chiclayae* Greene, 1934 e da exótica *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824). As moscas foram obtidas em frutos nativos, como *Spondias purpurea* L., *Spondias tuberosa* Arruda, *Psidium guajava* L. e *Eugenia uniflora* L., e exóticos, como *Averrhoa carambola* L. e *Terminalia catappa* L. As coletas abrangeram áreas de Natal, localidades costeiras (Alcaçuz, Jiqui, São José de Mipibu) e do interior (Caicó, Florânia, Santana dos Matos, Alto do Rodrigues). Os dados ratificam o potencial adaptativo de *D. areolatus* e *O. bellus* e consolidam base para o Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Palavras-chave: Controle biológico. Pragas. Inimigos naturais. Vespas. Parasitoides.

TITLE: Diversity, Distribution, and Tritrophic Interactions of Braconidae (Hymenoptera) Associated with Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in Rio Grande do Norte, Brazil

Abstract

Braconidae play a fundamental role in fruit fly biological control; however, information on their diversity in Rio Grande do Norte remains scattered. This study aimed to survey the occurrence, diversity, and tritrophic associations of these parasitoids in fruits and locations across the state, covering decades of collections. The study was based on samples from the Fruit Fly Laboratory at UFRN collected between 2000 and 2026. A total of 1,255 Braconidae specimens were recorded, belonging to three species: *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911), by far the predominant species; *Opius bellus* Gahan, 1930; and *Asobara anastrephae* (Muesebeck, 1958). The wasps emerged from puparia of *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), *Anastrepha sororcula* Zucchi, 1979, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), *Anastrepha zenildae* Zucchi, 1979, *Anastrepha serpentina* (Wiedemann, 1830), *Anastrepha chiclayae* Greene, 1934, and the exotic *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824). The flies were obtained from native fruits, such as *Spondias purpurea* L., *Spondias tuberosa* Arruda, *Psidium guajava* L., and *Eugenia uniflora* L., and exotic fruits, such as *Averrhoa carambola* L. and *Terminalia catappa* L. Collections covered areas of Natal, coastal localities (Alcaçuz, Jiqui, São José de Mipibu), and inland areas (Caicó, Florânia, Santana dos Matos, Alto do Rodrigues). The data confirm the adaptive potential of *D. areolatus* and *O. bellus* and provide a foundation for Integrated Pest Management (IPM).

Keywords: Biologic control. Pests. Natural enemies. Parasitoids. Wasps.

Introdução

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) estão entre as principais pragas da fruticultura, pois suas larvas se desenvolvem no interior dos frutos, causando danos que comprometem a produção e a comercialização. Algumas espécies também apresentam importância quarentenária, podendo restringir o trânsito de frutas. No Brasil, destacam-se espécies do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 e a espécie exótica *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), associadas a diversas plantas hospedeiras. A ocorrência desses tefritídeos está relacionada à disponibilidade de frutos e às condições ambientais, podendo apresentar diferenças entre regiões (SILVA *et al*., 2020).

Entre os principais inimigos naturais das moscas-das-frutas estão os parasitoides da ordem Hymenoptera, especialmente das famílias Braconidae e Figitidae. No Brasil, os braconídeos associados aos tefritídeos pertencem principalmente às subfamílias Opiinae e Alysiinae, com registros de espécies dos gêneros *Asobara*, *Doryctobracon*, *Opius* e *Utetes*. Entre eles, *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) destaca-se pela ampla distribuição e pela associação com diferentes espécies de *Anastrepha* e plantas hospedeiras (ARAÚJO; ZUCCHI, 2002; UCHÔA-FERNANDES *et al*., 2003; ALVARENGA *et al*., 2009). A diversidade de hospedeiros e as variações na composição das comunidades de parasitoides evidenciam a complexidade dessas relações.

A interação entre planta hospedeira, mosca-das-frutas e parasitoide constitui uma relação tritrófica, cuja caracterização contribui para compreender a estrutura das comunidades e os fatores associados à ocorrência dos inimigos naturais. Essas associações podem variar conforme a espécie vegetal, o tefritídeo e as condições

ambientais, incluindo diferenças entre plantas nativas e exóticas (ARAÚJO *et al*., 2015; ARAÚJO *et al*., 2025). O conhecimento dessas relações também é relevante para o controle biológico conservativo, uma vez que a identificação de plantas capazes de sustentar populações de parasitoides pode contribuir para sua permanência nos agroecossistemas e, consequentemente, para estratégias de Manejo Integrado de Pragas.

No Rio Grande do Norte, apesar da existência de registros de parasitoides associados a moscas-das-frutas, as informações permanecem dispersas entre diferentes localidades e períodos de amostragem. Araújo e Zucchi (2002) registraram braconídeos associados a *Anastrepha* na região de Mossoró/Assú, enquanto estudos posteriores ampliaram o conhecimento sobre parasitoides de tefritídeos no semiárido nordestino (ARAÚJO *et al*., 2015; SILVA *et al*., 2020). Entretanto, outras localidades e plantas hospedeiras ainda apresentam lacunas de conhecimento, dificultando uma compreensão mais ampla da distribuição e das associações entre parasitoides, tefritídeos e plantas no estado.

Diante disso, este estudo teve como objetivo caracterizar a ocorrência, a diversidade, a distribuição e as associações tritróficas de braconídeos parasitoides de moscas-das-frutas no Rio Grande do Norte, a partir de registros obtidos em diferentes localidades, plantas hospedeiras e períodos de amostragem pelo Laboratório de Moscas-das-Frutas (Labmosca/UFRN). A integração desses registros busca ampliar o conhecimento sobre a fauna regional e identificar padrões de associação entre parasitoides, tefritídeos e plantas hospedeiras, contribuindo para a avaliação de seu potencial no controle biológico conservativo e no Manejo Integrado de Pragas.

Metodologia

LOCAIS DAS COLETAS

As coletas e os levantamentos de dados foram conduzidos utilizando o acervo e o histórico de amostragens realizadas pelo Laboratório de Moscas-das-Frutas (Labmosca/UFRN) entre os anos de 2000 e 2026. O estudo abrangeu diversas localidades representativas do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, contemplando diferentes fitofisionomias, gradientes climáticos e regimes de manejo. As áreas amostradas incluíram localidades de diferentes municípios, como Alto do Rodrigues, Apodi, Arez, Assú, Caicó, Cerro Corá, Florânia, Goianinha, Ipanguaçu, Lagoa Nova, Natal, Nísia Floresta, Parnamirim, Pedro Avelino, Santana dos Matos, São Gonçalo do Amarante e São José de Mipibu. As amostragens foram efetuadas em quintais domésticos, pomares comerciais e fragmentos de vegetação nativa (remanescentes de Mata Atlântica e áreas de transição com a Caatinga), onde foram coletados frutos hospedeiros caídos no solo ou maduros diretamente nas árvores, priorizando aqueles que apresentavam sinais evidentes de infestação por larvas de moscas-das-frutas.

COLETA E PREPARO DOS FRUTOS

No campo, a localização exata e as condições ambientais de cada ponto de amostragem foram registradas com o auxílio de GPS e do aplicativo *Timestamp Camera* na versão

1.252, gerando registros fotográficos com coordenadas geográficas no formato decimal. Os frutos coletados foram acondicionados cuidadosamente em sacos plásticos resistentes para evitar esmagamento. Em situações de coletas remotas ou transporte prolongado, utilizou-se um procedimento alternativo consistindo no acondicionamento prévio dos frutos em bandejas plásticas forradas com vermiculita hidratada, cobertas com tecido tipo *voil* fixado com elásticos para assegurar a ventilação adequada e impedir a fuga das larvas, sendo devidamente etiquetadas com informações de localidade, data e identificação botânica.

No laboratório, os frutos foram submetidos à triagem e pesagem em balança analógica (capacidade de até 1 kg) ou balança de precisão, subtraindo-se o peso de recipientes auxiliares quando necessário. Em seguida, os frutos foram transferidos para o setor de criação e dispostos sobre bandejas ou potes plásticos contendo uma camada de vermiculita previamente umedecida, simulando a textura ideal para o empupamento (NASCIMENTO; CARVALHO, 2000). Os recipientes foram vedados com tecido *voil* preso por elásticos e identificados por meio de fitas adesivas contendo a localidade, a data de coleta, a espécie do fruto hospedeiro e marcações para o controle das avaliações semanais.

PENEIRAMENTO E ACOMPANHAMENTO

O monitoramento da vermiculita foi realizado semanalmente, totalizando três peneiradas consecutivas por bandeja com o uso de peneira fina. O material retido na peneira (pupários e resíduos) foi transferido para recipientes plásticos individuais inseridos em cubos de acrílico destinados à emergência dos insetos adultos. Os frutos remanescentes após a terceira peneirada foram descartados em lixeira comum, enquanto a vermiculita usada foi destinada à autoclavagem a 120 °C e 1 ATM por 15 a 20 minutos para posterior esterilização e reutilização. Os cubos de acrílico foram vistoriados semanalmente para a coleta dos adultos emergidos (moscas-das-frutas, parasitoides e entomofauna associada), os quais foram transferidos com auxílio de pinças finas para tubos de ensaio contendo álcool etílico a 70%.

IDENTIFICAÇÃO

Os espécimes preservados foram encaminhados para triagem sob microscópio estereoscópico, sendo separados em grandes grupos: moscas-das-frutas, vespas parasitoides e demais entomofauna associada. A identificação taxonômica dos Braconidae foi realizada com o suporte de chaves dicotômicas especializadas e referências taxonômicas atuais, como a apresentada por Marinho (2004), avaliando-se caracteres morfológicos diagnósticos como o padrão de venação alar e a morfologia mandibular. As moscas-das-frutas emergidas também foram identificadas ao nível específico com base em caracteres do padrão alar, morfologia externa e estrutura do acúleo. Por fim, procedeu-se à contagem individual e à sexagem dos parasitoides e hospedeiros sob estereomicroscópio, diferenciando fêmeas e machos com base na presença ou ausência do ovipositor visível. Todos os lotes foram acondicionados em frascos definitivos contendo álcool a 70% e rotulados internamente com papel vegetal e tinta resistente ao etanol, contendo dados de localidade, data e hospedeiro, integrando formalmente o acervo biológico do Labmosca/UFRN.

Resultados e Discussões

O número de espécimes identificadas foi de 1.255, classificadas entre três espécies: *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911); *Opius bellus* Gahan, 1930; e *Asobara anastrephae* (Muesebeck, 1958). A distribuição da abundância destas espécies é desproporcional, sendo *D. areolatus* predominante, aproximadamente 88,207% dos indivíduos, enquanto *O. bellus* e *A. anastrephae* representaram ~9,482% e ~2,311% dos registros respectivamente. Quanto à razão sexual das amostras, foram registrados: 615 fêmeas e 492 machos de *D. areolatus*, com razão de 1,25 fêmea : 1 macho; 62 fêmeas e 57 machos de *O. bellus*, com razão de aproximadamente 1,088 fêmea : 1 macho; 8 fêmeas e 21 machos de *A. anastrephae*, com razão de aproximadamente 0.381 fêmea : 1 macho (Tabela 1).

As áreas das amostras abrangeram 22 localidades distribuídas em 17 municípios do Rio Grande do Norte: São José do Mipibu, com 591 indivíduos; o Campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal), com 159 indivíduos; Massaranduba (São Gonçalo do Amarante), com 113 indivíduos; Parque das Dunas (ZPA de Natal), com 85 indivíduos; Jiqui (Parnamirim), com 69 indivíduos; Arez, com 47 indivíduos; Alto do Rodrigues, com 35 indivíduos; Lagoa Nova, com 35 indivíduos; Alcaçuz (Nísia Floresta), com 27 indivíduos; Pedro Avelino, com 17 indivíduos; Ipanguaçu, com 13 indivíduos; Assú, com 12 indivíduos; Florânia, com 12 indivíduos; Mata do Forte (ZPA de Natal), com 12 indivíduos; Natal, com 9 indivíduos; Cerro Corá, com 8 indivíduos; Tabuleiro Alto (Alto do Rodrigues), com 5 indivíduos; Caicó, com 3 indivíduos; Goianinha, com 2 indivíduos; Parque da Cidade (ZPA de Natal), com 2 indivíduos; Santana dos Matos, com 1 indivíduo; e o Sítio Cara Fosca (Apodi), com 1 indivíduo.

A distribuição temporal dos registros também não foi homogênea. Do total de 1.255 espécimes, 86,613% (1.087 indivíduos) foram obtidos em apenas quatro dos doze meses do ano (maio, março, fevereiro e junho, com 471, 261, 192 e 163 indivíduos, respectivamente), enquanto os demais oito meses somaram participação residual. Quanto à distribuição anual, os registros abrangeram 15 anos distintos entre 2000 e 2026, de forma desigual: o ano de 2025 concentrou isoladamente 644 indivíduos, correspondendo a 51,3% do total, seguido por 2019 (138 indivíduos), 2002 (118 indivíduos), 2018 (116 indivíduos) e 2026 (95 indivíduos), enquanto os demais dez anos contribuíram, cada um, com menos de 65 indivíduos.

Observou-se, ainda, concentração de registros em nível de localidade e de evento de coleta. São José de Mipibu, localidade com maior número de indivíduos (591, 47,1% do total), teve a totalidade de seus registros provenientes de apenas três datas de coleta, todas em 2025, resultando em uma média de aproximadamente 74 espécimes por evento amostral, valor muito superior ao observado nas demais localidades (13 indivíduos/evento no Campus da UFRN; 6 em Jiqui e no Parque das Dunas). Somente essas três datas de coleta em São José de Mipibu corresponderam a 48,3% de todos os espécimes de *D. areolatus* (535 de 1.107 indivíduos) registrados no estudo.

Foram utilizadas um total de 16 espécies de plantas hospedeiras para o estudo. A maioria das hospedeiras com registro de ocorrência dos braconídeos pertencem a duas

famílias: Myrtaceae, representada por *Campomanesia dichotoma* (O.Berg) Mattos (Guabiroba-de-pau, nativa), *Eugenia azeda* Sobral (Ubaia Azeda, nativa), *Eugenia ligustrina* (Sw.) Willd. (Ubaia-preta, nativa), *Eugenia uniflora* L. (Pitanga, nativa), *Myrciaria cuspidata* O.Berg (Camboim Amarelo, nativa) e *Psidium guajava* L. (Goiaba, nativa); e Anacardiaceae, representada por *Mangifera indica* L. (Manga, exótica), *Spondias purpurea* L. (Seriguela, exótica), *Spondias spp.* L. (Cajá, de origem indeterminada) e *Spondias tuberosa* Arruda (Umbu, nativa). Além destes, foram também encontrados registros de associação nas espécies *Averrhoa carambola* L. (Carambola, exótica), *Chrysobalanus icaco* L. (Guajiru, nativa), *Manilkara salzmannii* (A.DC.) H.J.Lam (Massaranduba, nativa), *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.) Hauenschild (Juá, nativa), *Terminalia catappa* L. (Castanhola, exótica) e *Vitex rufescens* A.Juss. (Maria-preta, nativa). A abundância dos indivíduos de Braconidae encontrados em associação a estes frutos é desigual e apenas em cajá (*Spondias spp.*) foram registradas 662 espécimes, representando ~52,749% do total (Tabela 1).

As espécies de moscas-das-frutas associadas à presença dos braconídeos foram 7, destas 6 pertencentes ao gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 e a espécie invasora *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), além de um registro sem emergência de tefritídeos. Dentre as espécies de *Anastrepha* presentes estão: *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), associada a 948 parasitoides; *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), associada a 253 parasitoides; *Anastrepha sororcula* Zucchi, 1979, associada a 147 parasitoides; *Anastrepha zenildae* Zucchi, 1979, associada a 68 parasitoides; *Anastrepha serpentina* (Wiedemann, 1830), associada a 4 parasitoides; e *Anastrepha chiclayae* Greene, 1934, associada a 1 parasitóide. A *C. capitata* apresentou um número expressivo de associações, totalizando 315 vespas.

A dominância de *Doryctobracon areolatus* observada neste levantamento está de acordo com o padrão já registrado para o Rio Grande do Norte por Araújo e Zucchi (2002), que encontraram essa espécie em 96,6% dos braconídeos obtidos na região de Mossoró/Assú, contra 88,2% verificados neste estudo. A proporção de *Asobara anastrephae* (2,3%) também se aproxima da relatada por esses autores para o mesmo estado (1,9%), reforçando a consistência regional desse padrão de abundância relativa. Já a ausência de *Utetes anastrephae*, presente em 1,5% dos registros de Araújo e Zucchi (2002), chama atenção, uma vez que essa espécie já foi documentada no estado e poderia ser esperada dado o volume amostral e a sobreposição de hospedeiros deste trabalho. A segregação observada entre *D. areolatus*, mais associado a espécies de *Anastrepha* em hospedeiros nativos, e *C. capitata*, predominante em frutos exóticos como *Terminalia catappa* e *Averrhoa carambola*, também acompanha o padrão descrito para o semiárido nordestino (ARAÚJO *et al*., 2015).

A análise da associação entre origem do hospedeiro e ocorrência de *Ceratitis capitata* reforça quantitativamente o padrão de segregação já discutido: nos hospedeiros classificados como exóticos (*Mangifera indica*, *Spondias purpurea*, *Averrhoa carambola* e *Terminalia catappa*), *C. capitata* esteve presente em 76,2% dos registros de emergência, contra apenas 13,6% nos hospedeiros nativos ou de origem indeterminada. Esse contraste é consistente com o padrão relatado para outras regiões do semiárido nordestino, no qual *C. capitata* tende a predominar em pomares e quintais com espécies frutíferas introduzidas, enquanto as espécies nativas de *Anastrepha* e seus parasitoides associados concentram-se preferencialmente em hospedeiros nativos (ARAÚJO *et al*., 2005). Esse resultado reforça a importância de plantas nativas, como

as Myrtaceae e *Spondias tuberosa*, na manutenção de populações de braconídeos associados a *Anastrepha*, com relevância direta para estratégias de controle biológico conservativo.

A avaliação das combinações tritróficas evidencia diferenças importantes na amplitude de hospedeiros entre as três espécies de braconídeos. *Doryctobracon areolatus* foi obtido em 14 das 16 espécies de plantas hospedeiras e associou-se a praticamente todas as espécies de moscas-das-frutas registradas, incluindo as seis espécies de *Anastrepha* e *C. capitata*, configurando um padrão claramente generalista dentro da teia tritrófica estudada. *Opius bellus* apresentou amplitude intermediária, associado a 11 hospedeiros e a quatro espécies de tefritídeos (*A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula* e *C. capitata*), enquanto *Asobara anastrephae* mostrou-se o mais restrito, com apenas três hospedeiros e três espécies de moscas associadas (*A. obliqua*, *A. zenildae* e *A. sororcula*), concentradas em cajá (*Spondias* spp.) e juá (*Sarcomphalus joazeiro*). Esse gradiente de amplitude de hospedeiros é consistente com o comportamento generalista já descrito para os braconídeos associados a *Anastrepha*, que parasitam indistintamente larvas de diferentes espécies de tefritídeos e respondem de forma diferenciada aos voláteis liberados pelos diversos hospedeiros frutíferos (ARAÚJO; ZUCCHI, 2002).

Outro aspecto relevante da estrutura tritrófica é a sobreposição de nicho entre *D. areolatus* e *O. bellus*, que compartilharam a maior parte das combinações hospedeiro/mosca mais representativas, como cajá associado a *A. obliqua* e pitanga (*Eugenia uniflora*) associada a *A. fraterculus* e *C. capitata*. Essa coocorrência indica que ambas as espécies exploram os mesmos recursos larvais dentro dos mesmos hospedeiros vegetais, um padrão de sobreposição de nicho já discutido para comunidades de Opiinae associadas a *Anastrepha*, e que pode refletir tanto disponibilidade compartilhada de hospedeiros quanto potencial competição por recursos entre os parasitoides (ARAÚJO; ZUCCHI, 2002; ALVARENGA *et al*., 2009). Já *A. anastrephae*, por sua vez, ocupou um nicho tritrófico mais segregado, associado principalmente a hospedeiros nativos com menor participação de *D. areolatus* e *O. bellus*, sugerindo menor sobreposição competitiva nesse segmento da comunidade.

A amplitude temporal e a diversidade de localidades e hospedeiros analisados representam um avanço frente aos estudos pontuais já publicados para o estado, como os de Araújo e Zucchi (2002) e Araújo *et al*. (2005), ampliando o conhecimento sobre a distribuição de braconídeos parasitoides no Rio Grande do Norte e confirmando, em maior escala, padrões antes descritos apenas para regiões específicas. Os registros de associação com hospedeiros pouco documentados, como *Vitex rufescens*, *Manilkara salzmannii* e *Chrysobalanus icaco*, dão continuidade à trajetória de descoberta de novas relações tritróficas já iniciada por Araújo, Zucchi e Canal (1996) no estado. Ao mesmo tempo, a ausência de *U. anastrephae* e a concentração da maior parte dos registros em poucas localidades indicam que a distribuição espacial completa desses parasitoides no estado ainda não está totalmente esclarecida, sendo uma lacuna a ser explorada em levantamentos futuros.

Do ponto de vista metodológico, a natureza histórica e não padronizada da amostragem, sem controle uniforme do esforço de coleta entre localidades e períodos, é um aspecto a considerar na interpretação das diferenças de abundância entre sítios. Essa irregularidade decorre, em parte, da dificuldade prática de manter uma frequência constante de visitas a campo em localidades distantes da sede do Labmosca/UFRN, em

Natal, o que resulta em coletas mais espaçadas, porém volumosas, quando realizadas. Da mesma forma, a ausência de índices de infestação e de parasitismo natural não se deve à falta de interesse nesse tipo de quantificação, mas ao fato de os dados aqui analisados correspondem apenas à parcela do acervo já triada e identificada até o momento, dentro de um conjunto bem mais amplo de amostras de moscas-das-frutas e entomofauna associada mantido pelo laboratório. Como a triagem depende da abertura individual de cada amostra para verificar a emergência ou não de parasitoides, grande parte do material permanece pendente de identificação completa, o que impede o estabelecimento de uma base confiável de pupários totais amostrados por localidade ou período, necessária ao cálculo dessas taxas. Esse mesmo fator explica, ainda, a maior concentração de registros em anos recentes, associada ao avanço do esforço de identificação do acervo, e não necessariamente a uma mudança real na abundância de braconídeos ao longo do tempo. A identificação morfológica das espécies, respaldada por chaves taxonômicas consolidadas (MARINHO, 2004), também poderia ser complementada por confirmação molecular em gêneros de separação mais sutil, como *Opius* e *Utetes*, embora esse tipo de análise demande recursos laboratoriais nem sempre disponíveis, o que mantém a identificação morfológica como uma alternativa válida e amplamente aceita na literatura da área.

Ainda assim, o volume de dados reunido, a extensão temporal da série histórica e a amplitude de hospedeiros e localidades cobertos consolidam este estudo como uma contribuição relevante para o conhecimento da fauna de braconídeos parasitoides de moscas-das-frutas no Rio Grande do Norte, fornecendo uma base sólida para o direcionamento de futuras estratégias de controle biológico conservativo no estado.

Conclusão

Este estudo caracterizou, pela primeira vez em escala ampla, a ocorrência, a diversidade e as associações tritróficas de braconídeos parasitoides de moscas-das-frutas no Rio Grande do Norte, a partir do acervo histórico do Labmosca/UFRN. Os resultados confirmam *Doryctobracon areolatus* como a espécie dominante e de maior amplitude de hospedeiros e tefritídeos associados, seguida por *Opius bellus*, de amplitude intermediária, e *Asobara anastrephae*, mais restrita e associada a um número menor de plantas e moscas-das-frutas. Esse gradiente de generalismo, somado à segregação observada entre *C. capitata* e hospedeiros exóticos, e entre espécies de *Anastrepha* e hospedeiros nativos, reforça o papel das plantas nativas na manutenção desses parasitoides nos agroecossistemas locais, com implicações diretas para o controle biológico conservativo.

A amplitude espacial e temporal do levantamento ampliou o conhecimento sobre a distribuição desses parasitoides no estado, incluindo novos registros de associação com hospedeiros pouco documentados na literatura regional. Ao mesmo tempo, a natureza histórica e não padronizada da amostragem, a ausência de *Utetes anastrephae* e a elevada proporção de combinações tritróficas conhecidas a partir de registros isolados indicam que a estrutura completa dessa comunidade de parasitoides ainda não está totalmente esclarecida no Rio Grande do Norte.

Recomenda-se que estudos futuros priorizem a padronização do esforço amostral entre localidades e períodos, de modo a permitir o cálculo de índices de infestação e parasitismo, além de confirmar, por meio de coletas repetidas, as associações tritróficas ainda registradas de forma pontual. Ainda assim, o conjunto de dados aqui reunido consolida uma base relevante para orientar futuras estratégias de Manejo Integrado de Pragas e de conservação de inimigos naturais das moscas-das-frutas no estado.

Referências

ALVARENGA, C. D.; MATRANGOLO, C. A. R.; LOPES, G. N.; SILVA, M. A.; LOPES, E. N.; ALVES, D. A.; NASCIMENTO, A. S.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitóides em plantas hospedeiras de três municípios do norte do Estado de Minas Gerais. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, n. 2, p. 195-204, 2009. DOI: https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p1952009.

ARAUJO, E. L.; ZUCCHI, R. A.; CANAL D., N. A. Caracterização e ocorrência de *Anastrepha zenildae* Zucchi (Diptera: Tephritidae) e seus parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) numa nova planta hospedeira, no Rio Grande do Norte. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 25, n. 1, p. 147-150, 1996. DOI: https://doi.org/10.37486/0301-8059.v25i1.1105.

ARAUJO, E. L.; ZUCCHI, R. A. Parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) na região de Mossoró/Assu, Estado do Rio Grande do Norte. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 2, p. 65-68, 2002. DOI: https://doi.org/10.1590/1808-1657v69n2p0652002.

ARAUJO, E. L.; MEDEIROS, M. K. M.; SILVA, V. E.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no semi-árido do Rio Grande do Norte: plantas hospedeiras e índices de infestação. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 6, p. 889-894, 2005. DOI: https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600003.

ARAUJO, E. L.; FERNANDES, E. C.; SILVA, R. I. R.; FERREIRA, A. D. C. L.; COSTA, V. A. Parasitoides (Hymenoptera) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no semiárido do Estado do Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 3, p. 610-616, 2015. DOI: https://doi.org/10.1590/0100-2945-188/14.

ARAUJO, E. S.; KRÜGER, A. P.; CALVO, M. V.; TELLES, M. H. F.; NEUMANN, A. M.; SCATONI, I. B.; COSTA, V. A.; NAVA, D. E.; MIRÁS-AVALOS, J. M.; GARCIA, F. R. M. Tritrophic interactions among fruit flies (Diptera: Tephritidae), its parasitoids and cultivated and wild hosts in the Pampa Biome, Rio Grande do Sul, Brazil. *Agriculture*, v. 15, n. 19, 1993, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/agriculture15191993.

MARINHO, C. F. *Espécies de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Estado de São Paulo: caracterização taxonômica, distribuição geográfica e percentagem de parasitismo*. 2004. 88 f. Dissertação

(Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. DOI: https://doi.org/10.11606/D.11.2004.tde-04062007-112747.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S.; MALAVASI, A. Monitoramento populacional. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 13, p. 109-112.

SILVA, B. K. A.; SILVA, H. M.; FERNANDES, E. C.; COSTA, V. A.; ARAUJO, E. L. Pupal parasitoids associated with *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in a semiarid environment in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 64, n. 2, e20190002, 2020. DOI: https://doi.org/10.1590/1806-9665-RBENT-2019-0002.

UCHÔA-FERNANDES, M. A.; MOLINA, R. M. S.; OLIVEIRA, I.; ZUCCHI, R. A.; CANAL, N. A.; DÍAZ, N. B. Larval endoparasitoids (Hymenoptera) of frugivorous flies (Diptera, Tephritoidea) reared from fruits of the Cerrado of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 47, n. 2, p. 181-186, 2003. DOI: https://doi.org/10.1590/S0085-56262003000200005.

Anexos



Tabela 1 - Indivíduos por espécie de parasitóide, fruto e moscas emergidas.

CÓDIGO: SB1339

AUTOR: LETÍCIA MARIA AZEVÊDO MARTINS

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: PERFIL COMPARATIVO DE TOXICIDADE IN SILICO PONDERADO POR EVIDÊNCIAS DOS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DO SARS-COV-2, ENSITRELVIR E NIRMATRELVIR

Resumo

Objetivo: Comparar in silico, de modo pareado e ponderado por evidências, os perfis toxicológicos de ensitrelvir e nirmatrelvir, os dois inibidores orais da protease principal do SARS-CoV-2, distinguindo os sinais compartilhados pela classe dos que discriminam as moléculas.

Métodos: Painel idêntico de 105 desfechos por composto foi gerado com ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0 e Pred-hERG5, totalizando 210 predições em 17 domínios. Cada par foi classificado como positivo ou negativo compartilhado, discriminante ou cruzado e confrontado com a literatura primária.

Resultados: Dos 93 pares classificáveis, 73 atribuíram a mesma classe aos dois compostos, 62 delas negativa, e 20 divergiram. Quatro domínios foram positivos compartilhados: genotoxicidade (ampla 1,000 e micronúcleo 1,000 em ambos), toxicidade respiratória, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. A maior separação foi hepática: ensitrelvir retornou lesão hepática induzida por fármaco 1,000 e hepatotoxicidade humana 0,994, contra 0,314 e 0,456 do nirmatrelvir. Ensitrelvir foi superior em hERG, carcinogenicidade, citotoxicidade em HEK293, hematotoxicidade e imunotoxicidade; nirmatrelvir, em toxicidade aguda oral e receptor X de pregnano.

Conclusão: A classe do alvo não determina o perfil toxicológico predito. Genotoxicidade, toxicidade respiratória, nefrotoxicidade e neurotoxicidade são prioridades de validação de classe; hepatotoxicidade e hERG exigem testes específicos por composto.

Palavras-chave: ensitrelvir; nirmatrelvir; toxicidade in silico; Mpro do SARS-CoV-2

TITLE: COMPARATIVE EVIDENCE-WEIGHTED IN SILICO TOXICITY PROFILING OF THE SARS-COV-2 MAIN PROTEASE INHIBITORS ENSITRELVIR AND NIRMATRELVIR

Abstract

Objective: To perform a matched, evidence-weighted in silico toxicity comparison of ensitrelvir and nirmatrelvir, the two oral SARS-CoV-2 main protease inhibitors, distinguishing safety signals shared by the class from those discriminating the molecules.

Methods: An identical panel of 105 endpoints per compound was generated with ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0 and Pred-hERG5, giving 210 predictions across 17 domains. Each matched pair was classified as shared positive or negative, discriminant or crossed, and compared with primary literature.

Results: Of 93 class-assignable pairs, 73 assigned both compounds to the same class, 62 of them negative, and 20 differed. Four domains were shared positive: genotoxicity (broad 1.000 and micronucleus 1.000 for both), respiratory toxicity, nephrotoxicity and neurotoxicity. The largest separation was hepatic: ensitrelvir returned drug-induced liver injury 1.000 and human hepatotoxicity 0.994, against 0.314 and 0.456 for nirmatrelvir. Ensitrelvir was higher at hERG-related, carcinogenicity, HEK293 cytotoxicity, hematotoxicity and immunotoxicity endpoints; nirmatrelvir at rat oral acute toxicity, oxidative stress response and pregnane X receptor endpoints.

Conclusion: Target class does not determine predicted toxicological profile. Genotoxicity, respiratory toxicity, nephrotoxicity and neurotoxicity are class-level validation priorities; hepatic and hERG endpoints require compound-specific testing.

Keywords: ensitrelvir; nirmatrelvir; in silico toxicity; SARS-CoV-2 Mpro

Introdução

Os antivirais orais de ação direta contra o SARS-CoV-2 são administrados em cursos curtos a populações ambulatoriais amplas e heterogêneas, que incluem indivíduos com comprometimento renal ou hepático, pacientes com doença leve e contatos assintomáticos em profilaxia pós-exposição. A combinação de exposição ampla e administração breve torna as exigências de tolerabilidade mais estritas do que as de terapias reservadas a pacientes críticos e faz com que a caracterização toxicológica precoce importe sobretudo para direcionar investigação experimental subsequente, e não para confirmar segurança clínica.

Dois inibidores orais da protease principal do SARS-CoV-2, ou Mpro, encontram-se em uso clínico e diferem entre si em quase todos os aspectos estruturais, embora compartilhem um único alvo molecular. O nirmatrelvir é um peptidomimético cuja ogiva nitrila ocupa o sítio ativo e forma aduto covalente reversível com o resíduo catalítico Cys145, mecanismo estabelecido por ensaios enzimáticos, espectrometria de massas e cristalografia.1 O ensitrelvir, desenvolvido como S-217622 e administrado clinicamente como ensitrelvir fumarato, é um inibidor não peptídico e não covalente cujo núcleo triazinodiona carrega três elementos farmacofóricos: um 1-metil-1,2,4-triazol dirigido a S1, um grupo 2,4,5-trifluorobenzila ocupando S2 e um 6-cloro-2-metilindazol dirigido a S1'.2 O modo de ligação não covalente foi resolvido cristalograficamente e confirmado independentemente.2,3 O ensitrelvir não possui, portanto, a ogiva eletrofílica reativa do

nirmatrelvir, o que elimina uma responsabilidade estrutural clássica sem definir por si só seu perfil toxicológico.

Uma segunda assimetria é farmacológica. O nirmatrelvir é administrado em associação ao ritonavir, potencializador farmacocinético deliberado e não componente estrutural da molécula: estudos dedicados atribuíram predominantemente a ele as interações mediadas pelo citocromo P450 3A, com aumento de cerca de 14,3 vezes na área sob a curva do midazolam.4 O ensitrelvir é administrado como agente único. A comparação deve ser conduzida no nível das entidades químicas individuais.

A terceira assimetria diz respeito à evidência disponível e é a mais consequente para a interpretação. Para o nirmatrelvir, parte substancial do pacote de segurança não clínica foi publicada como literatura primária: farmacologia de segurança e toxicidade de doses repetidas em ratos e macacos,5 fertilidade e desenvolvimento embriofetal em ratos e coelhos,6 ensaio pivotal randomizado7 e farmacologia clínica humana.8,9 Para o ensitrelvir a situação se inverte: o registro clínico é bem documentado, com estudo de primeira administração em humanos,10 estudo em comprometimento renal11 e três ensaios de fase 3 em tratamento e profilaxia pós-exposição,12-14 mas não se identificou como fonte primária verificável nenhuma concentração inibitória hERG específica, análise concentração-QTc, ensaio de mutação reversa bacteriana ou de micronúcleo, estudo de toxicidade de órgão em doses repetidas ou de carcinogenicidade, sendo o trabalho animal primário dirigido à eficácia antiviral.15

A toxicologia computacional apoia a comparação ao rastrear simultaneamente muitos desfechos sob condições idênticas.16-20 Aplicar painel idêntico a duas moléculas que compartilham o alvo acrescenta um segundo eixo: um sinal retornado para ambos é candidato a propriedade de classe ou a artefato do espaço químico compartilhado, ao passo que um sinal restrito a uma molécula identifica responsabilidade estrutural específica. Este estudo objetivou conduzir comparação toxicológica in silico pareada e ponderada por evidências entre ensitrelvir e nirmatrelvir, classificando cada par de desfechos como compartilhado ou discriminante, integrando as saídas computacionais à evidência experimental primária de cada molécula e definindo quais prioridades de validação se aplicam à classe e quais a apenas um composto.

Metodologia

O estudo foi conduzido como comparação toxicológica in silico pareada e ponderada por evidências entre ensitrelvir e nirmatrelvir. As predições foram geradas sob condições idênticas e integradas à evidência primária disponível para cada composto, a fim de avaliar a concordância entre ferramentas, distinguir sinais compartilhados de específicos e definir lacunas. A análise não visou estabelecer segurança clínica, hierarquizar os produtos ou substituir a toxicologia experimental.

As entradas moleculares foram verificadas antes do uso, em vez de adotadas de banco de dados químico. Para o ensitrelvir empregou-se, nas cinco plataformas, a SMILES da base livre
CN1C=NC(CN2C(=O)NC(=NC3=CC4=CN(C)N=C4C=C3Cl)N(CC3=CC(F)=C(F)C=

C3F)C2=O)=N1. O InChIKey recalculado foi QMPBBNUOBOFBFS-UHFFFAOYSA-N, coincidente com o identificador de referência; a fórmula derivada foi C22H17ClF3N9O2, massa monoisotópica 531,1146 Da; a estrutura resolveu-se em fragmento único, confirmando submissão da base livre; e os três elementos farmacofóricos e o núcleo triazinodiona foram confirmados por subestrutura. A molécula não possui centro estereogênico, confirmado pelo bloco UHFFFAOYSA. O sal fumarato do produto clínico não foi modelado, pois as plataformas operam sobre a estrutura neutra parental.

Para o nirmatrelvir empregou-se a SMILES isomérica [H][C@]12CN([C@H](C(=O)N[C@@H](C[C@]3([H])CCNC3=O)C#N)[C@@]1([H])C2(C)C)C(=O)[C@@H](NC(=O)C(F)(F)F)C(C)(C)C. O InChIKey recalculado foi LIENCHBZNNMNKG-OJFNHCPVSA-N, coincidente com a referência; a fórmula derivada foi C23H32F3N5O4, massa monoisotópica 499,2406 Da; os seis centros estereogênicos tiveram atribuição explícita, sem centro indefinido; e a ogiva nitrila, a trifluoroacetamida, a gama-lactama derivada de glutamina e o núcleo 6,6-dimetil-3-azabiciclo[3.1.0]hexano foram confirmados por subestrutura. Como o ritonavir é potencializador coadministrado e não componente estrutural, as interpretações referem-se a cada antiviral como entidade única.4

As predições foram geradas em ADMETlab 3.0,16 ProTox 3.0,17 Deep-PK,18 admetSAR 3.019 e Pred-hERG5,20 selecionadas por cobertura, desempenho relatado e dados de validação. O ADMETlab 3.0 inclui 36 propriedades de toxicidade e 77 modelos, com área sob a curva ROC entre 0,72 e 0,99.16 O ProTox 3.0 fornece 61 modelos, com área sob a curva externa de 0,89 a 0,95 nos de toxicidade de órgão.17 O Deep-PK compreende 73 tarefas, incluindo 35 ensaios de toxicidade.18 O admetSAR 3.0 fornece 119 desfechos, com área sob a curva média de 0,870.19 O Pred-hERG5, especializado em hERG, apresentou acurácia balanceada de 0,82 e coeficiente de Matthews de 0,65.20 Essas figuras são de nível de plataforma e não constituem validação específica para os compostos.

Para cada desfecho extraíram-se ferramenta, valor, classe, probabilidade ou escore, tamanho do conjunto e métricas relatadas. As saídas foram compiladas em tabela mestra e organizadas em dezessete domínios: toxicidade sistêmica; cardiotoxicidade hERG; hepatotoxicidade e lesão hepática induzida por fármaco; nefrotoxicidade; toxicidade respiratória; neurotoxicidade; ototoxicidade; genotoxicidade; carcinogenicidade; toxicidade celular; estresse-resposta e mitocôndria; imunotoxicidade; hematotoxicidade; toxicidade endócrina; alvos associados à toxicidade; tolerância local; e toxicidade ambiental. Como as convenções de relato diferem, as saídas foram normalizadas: ADMETlab 3.0 e admetSAR 3.0 lidos como probabilidade da categoria tóxica; Deep-PK, como classe com probabilidade; ProTox 3.0, como classe com escore de confiança, de modo que valor alto em classe inativa denota negativo confiante.

A comparação foi conduzida par a par no nível do desfecho. Como o mesmo painel foi aplicado às duas moléculas, diferenças entre os valores não podem ser atribuídas a escolha de modelo, versão ou limiar. As probabilidades foram categorizadas segundo as faixas documentadas: abaixo de 0,3 como baixa, entre 0,3 e 0,7 como intermediária e igual ou superior a 0,7 como alta. Cada par foi classificado como positivo compartilhado, negativo compartilhado, discriminante em favor de um dos compostos ou cruzado, quando as ferramentas os posicionaram em direções opostas. Desfechos de regressão em escalas

internas sem unidade foram examinados descritivamente, e a classificação por domínio seguiu o padrão do conjunto.

Desfechos duplicados foram mantidos, porque concordância e discordância entre ferramentas eram relevantes, e resultados positivos e negativos foram preservados para evitar relato seletivo. A priorização considerou relevância toxicológica, concordância entre ferramentas, magnitude e direção da diferença entre compostos, plausibilidade biológica e disponibilidade de comparadores externos. Saídas internamente inconsistentes foram classificadas como não interpretáveis e excluídas da priorização, e toda saída foi triada contra um piso de confiabilidade definido por coeficiente de Matthews inferior a 0,45 ou de determinação inferior a 0,50.

Realizou-se busca dirigida da literatura primária para ambos os compostos, cobrindo farmacologia de segurança, doses repetidas, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, genotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade de órgão e celular, efeitos hematológicos e imunes e eletrofisiologia cardíaca. Bulas, documentos regulatórios, monografias, bases comerciais e comunicados não foram considerados evidência primária, e afirmações rastreáveis apenas a essas fontes foram registradas como lacunas. Achados em animais nunca foram convertidos em afirmações clínicas, e a ausência de estudo nunca foi codificada como resultado negativo. Usaram-se apenas predições computacionais e literatura primária pública, sem dados de pacientes, dispensando aprovação ética. O arcabouço é consistente com estudos prévios que combinaram múltiplas plataformas in silico e integraram os achados a evidências experimentais.23-27

Resultados e Discussões

O painel produziu 105 predições por composto, e portanto 210 no total, distribuídas identicamente: 37 saídas do ProTox 3.0, 36 do ADMETlab 3.0, 30 do Deep-PK, uma do Pred-hERG5 e uma do admetSAR 3.0. Todo desfecho esteve disponível como par pareado. Dos 105 pares, 12 eram saídas de regressão em escalas internas, examinadas descritivamente. Entre os 93 pares classificáveis restantes, 73 alocaram os dois compostos na mesma categoria, 62 deles negativa e 11 positiva, e 20 os separaram; desses, 14 atribuíram a saída superior ao ensitrelvir e seis ao nirmatrelvir. Os perfis preditos são dominados por negativos compartilhados, com pequeno conjunto de positivos compartilhados e um grupo de desfechos discriminantes concentrados em poucos domínios.

GENOTOXICIDADE. Este domínio conteve as saídas convergentes mais fortes dos dois conjuntos e produziu valores máximos idênticos para os dois compostos. O ADMETlab 3.0 retornou genotoxicidade ampla de 1,000 para ambos, pelo modelo de melhor desempenho entre os desfechos priorizados (área sob a curva 0,961; coeficiente de Matthews 0,774), e o Deep-PK retornou micronúcleo tóxico com probabilidade de 1,000 para ambos (Matthews 0,80). A mutagenicidade bacteriana comportou-se de modo oposto, discordante para ambos em direções especulares: para o ensitrelvir, o ADMETlab 3.0 retornou Ames 0,940 enquanto o Deep-PK classificou como seguro com 0,134 e o admetSAR 3.0 retornou 0,371; para o nirmatrelvir, os mesmos modelos retornaram 0,559,

classe tóxica com 0,951 e 0,054. O ProTox 3.0 classificou mutagenicidade como ativa para ensitrelvir e inativa para nirmatrelvir, ambos com escore de 0,57. Os desfechos de estresse-resposta ligados a dano no DNA não acompanharam o sinal amplo: SR-p53 foi 0,001 e 0,167, e SR-ATAD5, 0,000 e 0,051, inativos ou seguros nas demais ferramentas.

A genotoxicidade é a instância mais instrutiva de sinal de classe. Duas moléculas quimicamente não relacionadas, uma com ogiva nitrila eletrofílica e outra sem ogiva reativa, receberam a saída máxima do mesmo classificador e a probabilidade máxima de micronúcleo de uma segunda plataforma. Se a ogiva estivesse dirigindo a predição, o ensitrelvir não deveria reproduzi-la, e ele a reproduz exatamente. A leitura mais parcimoniosa é que os classificadores respondem a características compartilhadas pelos dois arcabouços, ou à região do espaço químico ocupada pelos inibidores da Mpro, e não a uma responsabilidade eletrofílica específica. Dois aspectos moderam o domínio: o desfecho amplo agrega resultados heterogêneos e não equivale a qualquer ensaio isolado, e as saídas negativas de SR-p53 e SR-ATAD5 argumentam contra mecanismo clássico de dano no DNA. Quando três plataformas discordam nessa extensão e invertem sua ordem relativa entre os compostos, o desfecho está computacionalmente irresolvido para ambos. Nenhum relato primário de mutação reversa ou de micronúcleo satisfazendo o critério de evidência foi identificado, de modo que o domínio de sinal computacional mais forte é o de suporte auditável mais fraco.

TOXICIDADE RESPIRATÓRIA. Foi o domínio de órgão com concordância mais clara, convergente-positivo em três plataformas para cada composto. Para o ensitrelvir, o Deep-PK retornou classe tóxica com 0,995, o ProTox 3.0 classe ativa com 0,83 e o ADMETlab 3.0 predisse 0,689. Para o nirmatrelvir, o ADMETlab 3.0 retornou 0,988, o valor de órgão mais alto daquele conjunto, o ProTox 3.0 classe ativa com 0,70 e o Deep-PK classe tóxica com 0,809. O desfecho em linhagem pulmonar não acompanhou o sinal de órgão: citotoxicidade em A549 de 0,080 e 0,032. Para o nirmatrelvir há contrapartida experimental direcional: dose oral única de 1000 mg/kg em ratos produziu aumento de cerca de 44% na frequência respiratória, normalizado em poucas horas e sem alteração persistente da bateria observacional funcional.5 O achado é, porém, alteração funcional transitória em exposição muito elevada, não lesão histopatológica. Para o ensitrelvir nenhum relato primário comparável foi identificado. A distinção entre classificação de triagem e fenótipo clínico importa sobretudo em pacientes com infecção respiratória ativa, nos quais um evento emergente seria difícil de separar da progressão da doença.14

NEFROTOXICIDADE E TOXICIDADE CELULAR. A nefrotoxicidade produziu a mesma discordância interna nos dois conjuntos: o ADMETlab 3.0 retornou 0,993 e 0,938, entre as saídas de órgão mais altas de cada conjunto, enquanto o ProTox 3.0 classificou o domínio como inativo, com 0,58 e 0,60. Foi priorizado para ambos com base em plataforma única, cujo modelo relata coeficiente de Matthews de 0,471. A toxicidade celular, em contraste, separou nitidamente as moléculas na linhagem mais relevante para a predição renal: 0,847 para citotoxicidade em HEK293 no ensitrelvir contra 0,130 no nirmatrelvir, diferença de 0,717 e terceira maior separação registrada naquela escala. As demais saídas celulares foram baixas para ambos: A549 de 0,080 e 0,032, RPMI-8226 de 0,056 e 0,035, e citotoxicidade ampla inativa no ProTox 3.0. A coincidência de predição renal de órgão e de linhagem renal em um composto e não no outro é sugestiva, mas ambas provêm da mesma plataforma, de modo que a coerência é interna, não independente. Nenhuma delas deve ser confundida com os dados renais clínicos, que descrevem como a função renal comprometida altera a exposição, e não se o composto

lesa o rim; a exposição aumenta com o grau de comprometimento para ambos.9,11 Para o nirmatrelvir, os estudos primários de doses repetidas não identificaram o rim como órgão-alvo.5

HEPATOTOXICIDADE E LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR FÁRMACO. O domínio hepático produziu a maior e mais sistemática separação e foi o único em que todos os desfechos se moveram na mesma direção. Para o ensitrelvir, o ADMETlab 3.0 retornou o valor máximo de 1,000 para lesão hepática induzida por fármaco e 0,994 para hepatotoxicidade humana, e o Deep-PK classificou-o como tóxico com 0,693; para o nirmatrelvir, os mesmos modelos retornaram 0,314, 0,456 e classe segura com 0,222. O ProTox 3.0 classificou hepatotoxicidade humana como inativa para ambos, mas com confiança diferente: 0,55 para ensitrelvir, o menor valor de seu painel de órgão, contra 0,87 para nirmatrelvir. As diferenças de 0,686 e 0,538 ocupam a quarta e a sexta posições entre as separações registradas na escala do ADMETlab 3.0, e a coerência interna desse padrão é incomum. Trata-se, ainda assim, de classificação estrutural feita sem referência a dose ou exposição, e deve ser lida contra registros clínicos que não sustentam diferença dessa magnitude: nenhum dos compostos produziu sinal consistente de lesão hepática grave em seus ensaios randomizados,7,12-14 e para o nirmatrelvir a evidência primária descreve hipertrofia hepatocelular adaptativa e reversível em ratos e elevações reversíveis de transaminases em macacos a 600 mg/kg/dia sem correlato histopatológico.5 O contraste reflete o que cada fonte detecta: cursos curtos em ensaios com critérios de exclusão são pouco adequados para lesão hepática idiossincrática rara, e eventos hepáticos sob o regime combinado não podem ser atribuídos a um componente isolado.4 Registre-se ainda que as reduções reversíveis de lipoproteína de alta densidade observadas clinicamente com ensitrelvir não são captadas por nenhum desfecho do painel.10,12

CARDIOTOXICIDADE RELACIONADA AO hERG. O domínio cardíaco separou os compostos na mesma direção, com magnitude absoluta menor. O Pred-hERG5 retornou classe de bloqueador moderado para o ensitrelvir, com pIC50 predito de 5,394, acima do limite de 5,0 e, sob o critério binário de 10 µM, do lado bloqueador do limiar. Para o nirmatrelvir a mesma ferramenta retornou consenso de não bloqueador, com regressão de 4,953, valor situado apenas 0,047 unidades logarítmicas abaixo do corte moderado; a diferença entre compostos no eixo de regressão é de 0,441. O ADMETlab 3.0 separou-os na mesma direção e mais claramente: bloqueadores de hERG retornou 0,172 e 0,029, e bloqueadores a 10 µM retornou 0,389 e 0,095. Ambos os valores de ensitrelvir permanecem abaixo do limiar de decisão, mas o posicionam cerca de quatro vezes acima do nirmatrelvir. O ProTox 3.0 classificou cardiotoxicidade ampla como inativa para ambos, e receptor de rianodina e canal de sódio dependente de voltagem foram inativos. Para o nirmatrelvir, a evidência primária aponta na mesma direção: em macacos cynomolgus telemetrizados, alterações cardiovasculares surgiram sobretudo a 75 mg/kg duas vezes ao dia, com aumento transitório da pressão arterial e redução da frequência cardíaca, sem prolongamento de QTc nem arritmia, com concentração máxima de cerca de 14,7 µg/mL,5 aproximadamente três vezes a concentração humana em estado estacionário de 5,1 µg/mL.8 Para o ensitrelvir, um pIC50 de 5,394 corresponde a concentração micromolar e, isoladamente, não seria alerta de alta prioridade; sua relevância decorre da ausência de contrapartida experimental. A caracterização direta por patch-clamp, com comparação a exposições clinicamente relevantes, é a única medida capaz de tornar esse lado do domínio interpretável.

NEUROTOXICIDADE E OTOTOXICIDADE. Ambos os modelos gerais produziram achados positivos para os dois compostos: o ADMETlab 3.0 predisse neurotoxicidade induzida por fármaco em 0,999 para ensitrelvir e 0,898 para nirmatrelvir, e o ProTox 3.0 retornou classes ativas com 0,89 e 0,61. No painel de alvos neurais, acetilcolinesterase, receptores de rianodina, GABA, NMDA, AMPA e cainato e canal de sódio dependente de voltagem foram inativos para ambos, de modo que nenhuma saída em nível de alvo sustentou a predição ampla. Dois desfechos adicionais separaram os compostos: o ADMETlab 3.0 retornou penetração na barreira hematoencefálica de 0,004 e 0,000, enquanto o do ProTox 3.0 mede toxicidade da barreira, e não penetração, sendo ativo para ensitrelvir com 0,85 e inativo para nirmatrelvir com 0,52. As contrapartidas primárias são modestas: efeitos funcionais transitórios a 1000 mg/kg em ratos, sem correlato neuro-histopatológico, para o nirmatrelvir,5 e eventos neurológicos leves no registro clínico do ensitrelvir, com cefaleia como o mais frequente.10 O padrão favorece avaliação inicial de viabilidade neuronal, estresse oxidativo e função mitocondrial, sem atribuir o efeito predito a via específica. A ototoxicidade foi alta para ambos, 0,968 e 0,827, a partir de modelo único (Matthews 0,406), sem ferramenta corroborante nem comparador admissível, sendo retida como achado exploratório compartilhado.

CARCINOGENICIDADE, HEMATOTOXICIDADE E IMUNOTOXICIDADE. Os três domínios discriminaram na mesma direção do hepático, cada um com base em saída positiva única para o ensitrelvir. A carcinogenicidade produziu a segunda maior separação da escala do ADMETlab 3.0: 0,926 contra 0,180, enquanto o ProTox 3.0 a classificou como inativa para ambos e o Deep-PK retornou classes seguras com 0,308 e 0,177. O positivo limitou-se a uma plataforma e a um composto, pelo modelo de pior desempenho do painel (área sob a curva 0,745; Matthews 0,342). A hematotoxicidade, de ferramenta única, retornou 0,618 e 0,170. Para a imunotoxicidade, o ProTox 3.0 retornou classe ativa para ensitrelvir com 0,92 e inativa para nirmatrelvir com 0,63, enquanto a saída em RPMI-8226 foi baixa para ambos: as saídas global e celular concordaram para o nirmatrelvir e se contradisseram para o ensitrelvir. Para o nirmatrelvir, a hematotoxicidade é contradita por evidência primária na direção informativa: estudos de doses repetidas em ratos relataram prolongamento do tempo de protrombina de 1,06 a 2,50 vezes os controles e contagens de plaquetas de 1,12 a 1,28 vezes os controles a partir de 200 mg/kg/dia.5 Essas alterações foram julgadas não adversas e reversíveis, não constituindo toxicidade hematológica clínica; são, porém, efeito biológico dose-dependente que a saída computacional baixa não captou, porque classificadores de hematotoxicidade são treinados em citopenias e toxicidade medular e não codificam efeitos sobre a coagulação. A observação transfere-se ao ensitrelvir.

TOXICIDADE SISTÊMICA. Este domínio separou os compostos na direção oposta. O ADMETlab 3.0 predisse toxicidade aguda oral em ratos de 0,488 para ensitrelvir, valor adjacente ao limiar, e de 0,915 para nirmatrelvir, correspondente a alta probabilidade da categoria de dose letal mediana inferior a 500 mg/kg. A dose diária máxima recomendada foi semelhante para ambos, 0,845 e 0,863, e o ProTox 3.0 classificou toxicidade clínica ampla como ativa para os dois, com 0,57 e 0,63. O Deep-PK retornou 2,69 e 3,28 para dose letal mediana aguda e 1,25 e 1,46 para o menor nível de efeito adverso crônico, em escalas internas sem unidade. A dose máxima tolerada foi 0,47 e −0,01 log(mg/kg/dia), com a ressalva de que a plataforma rotula valores iguais ou inferiores a 0,477 como não tóxicos, convenção contrária à leitura usual. O valor de 0,915 é diretamente contradito por dados primários nos quais ratos toleraram até 1000 mg/kg/dia por um mês sem achados adversos, e dose única de 1000 mg/kg produziu apenas efeitos funcionais

transitórios.5 Em conjunto com as saídas de dose diária máxima, quase idênticas apesar de doses clínicas distintas, esses desfechos comportam-se como classificadores estruturais de classe de dose, não como preditores de toxicidade.

RESPOSTA AO ESTRESSE E DESFECHOS MITOCONDRIAL E ENDÓCRINO. O potencial de membrana mitocondrial foi consistentemente negativo nas três ferramentas: SR-MMP de 0,000 e 0,045, inativo no ProTox 3.0 e seguro no Deep-PK. O elemento de resposta antioxidante foi o único desfecho cruzado: o ADMETlab 3.0 retornou 0,048 para ensitrelvir e 0,942 para nirmatrelvir, a maior separação daquela escala, enquanto o Deep-PK inverteu a ordem, classificando ensitrelvir como tóxico com 0,626 e nirmatrelvir como seguro com 0,115; o ProTox 3.0 classificou-o como inativo para ambos. Nenhuma direção consistente pode ser atribuída, e o domínio permanece exploratório. Os desfechos endócrinos foram predominantemente baixos, inativos ou seguros nas três plataformas: no ADMETlab 3.0, entre 0,000 e 0,012 para ensitrelvir e entre 0,001 e 0,232 para nirmatrelvir nos receptores de androgênio e estrogênio, aromatase e PPAR-gama; o ProTox 3.0 os classificou como inativos, com escores entre 0,86 e 0,98. Entre os alvos restantes, o receptor X de pregnano foi o único que mudou de classe: inativo para ensitrelvir com 0,63 e ativo para nirmatrelvir com 0,66. Esse resultado converge com fenótipo primário em roedores, no qual o estudo de um mês descreveu alterações adaptativas em tireoide e hipófise, aumento do peso hepático de até cerca de 1,83 vez os controles e hipertrofia hepatocelular periportal,5 padrão clássico de indução enzimática com depuração secundária de hormônio tireoidiano. Como o receptor X de pregnano é o principal regulador transcricional do citocromo P450 3A e o regime clínico inibe essa enzima com ritonavir,4 qualquer potencial intrínseco de indução permaneceria mascarado clinicamente e teria de ser caracterizado in vitro.

TOLERÂNCIA LOCAL E TOXICIDADE AMBIENTAL. A tolerância local ocular foi negativa para ambos, pelos modelos de melhor desempenho do painel: 0,000 para corrosão ocular em ambos, com área sob a curva de 0,996, e 0,002 e 0,083 para irritação ocular; o Deep-PK retornou classes seguras. A sensibilização cutânea separou as moléculas, com 0,020 e 0,586, valor limítrofe de relevância limitada para composto oral. A toxicidade ambiental produziu resultados mistos: ecotoxicidade inativa para ambos, com escores limítrofes; toxicidade para abelhas tóxica para os dois, com 0,54 e 0,939; e toxicidade aviária segura. Três saídas atenderam ao critério de não interpretabilidade: as concentrações de inibição de crescimento do Deep-PK, inconsistentes com as do ADMETlab 3.0; a biodegradação do Deep-PK, com conjunto relatado de 1,66; e a única saída do admetSAR 3.0, com conjunto de zero registros.

SÍNTESE. Quatro domínios foram positivos compartilhados: genotoxicidade com formação de micronúcleo, toxicidade respiratória, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, com ototoxicidade alta em ferramenta única para ambos. Seis discriminaram em favor do ensitrelvir: hepatotoxicidade e lesão hepática induzida por fármaco, eletrofisiologia relacionada ao hERG, carcinogenicidade, citotoxicidade em HEK293, hematotoxicidade e imunotoxicidade. Quatro discriminaram na direção oposta: toxicidade aguda sistêmica, elemento de resposta antioxidante em uma das três ferramentas, receptor X de pregnano e sensibilização cutânea. Desfechos mitocondriais, endócrinos, de alvos neurais e oculares foram convergentes-negativos para ambos, o que reduz a prioridade desses domínios. Dois domínios ilustram o modo de falha oposto, no qual há achados experimentais que o painel não representa: coagulação e hemostasia, e toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, para a qual nenhum desfecho existe nas cinco

plataformas, embora estudos primários tenham estabelecido, para o nirmatrelvir, ausência de efeito adverso sobre fertilidade em ratos até 1000 mg/kg/dia, ausência de padrão teratogênico e nível sem efeito adverso de 300 mg/kg/dia em coelhos.6 Uma saída negativa ou ausente não deve, portanto, ser lida como ausência de efeito biológico.

A assimetria de evidências é, ela própria, um achado desta comparação e restringe toda conclusão dela derivada. Para o nirmatrelvir, oito domínios puderam ser lidos contra ao menos um relato experimental primário diretamente inspecionado; para o ensitrelvir, nenhum dos domínios priorizados. Essa diferença não torna as predições de um mais fracas nem indica que um composto seja mais seguro: ela muda aquilo contra o que cada predição pode ser testada. Onde os compostos diferem e um lado dispõe de comparador primário, como nos domínios hepático e cardíaco, a comparação identifica qual molécula examinar primeiro. Onde nenhum lado dispõe de comparador, como em carcinogenicidade e toxicidade celular, a diferença permanece entre modelos aplicados a duas estruturas. As demais limitações decorrem do critério restritivo de evidência, da representação desigual dos domínios entre plataformas e da avaliação de vários desfechos por plataforma única. Por fim, o desenho de painel igual implica que qualquer viés sistemático de um modelo dentro do espaço químico dos inibidores da Mpro afetaria ambos os compostos na mesma direção e seria invisível à própria comparação.

Os achados sustentam um programa experimental sequencial organizado conforme a prioridade se aplique à classe ou a uma molécula. O primeiro nível é compartilhado: testes independentes de genotoxicidade para ambos, incluindo mutação reversa bacteriana, dano cromossômico in vitro e micronúcleo in vivo, além de ensaios de função respiratória e em células das vias aéreas ancorados a exposições clínicas. O segundo nível é específico por composto e dominado pelo ensitrelvir: modelos hepatocitários de lesão e função mitocondrial e determinação direta de hERG por patch-clamp com cálculo de margem de exposição. O terceiro é novamente compartilhado: modelos de células tubulares proximais renais em concentrações representativas de comprometimento renal grave, ensaios hematológicos focados em coagulação, caracterização in vitro da ativação do receptor X de pregnano e do potencial de indução do citocromo P450 3A em hepatócitos humanos, e ensaios de viabilidade neuronal. Carcinogenicidade, desfechos endócrinos, tolerância ocular e desfechos ambientais não exigem atenção experimental imediata com base neste conjunto de dados.

Conclusão

Esta comparação in silico pareada entre ensitrelvir e nirmatrelvir sob painel idêntico de 105 desfechos mostrou que os dois inibidores da protease principal compartilham um alvo molecular, mas não um perfil toxicológico predito. Setenta e três dos noventa e três pares classificáveis alocaram ambos os compostos na mesma categoria, sessenta e dois deles negativa, e vinte os separaram.

Genotoxicidade com formação de micronúcleo, toxicidade respiratória, nefrotoxicidade e neurotoxicidade foram positivas para as duas moléculas e constituem, portanto, prioridades de validação em nível de classe; a ototoxicidade foi alta para ambos a partir de ferramenta única. A hepatotoxicidade e a lesão hepática induzida por fármaco

produziram a maior e mais sistemática separação, com todos os desfechos positivos para o ensitrelvir e negativos a limítrofes para o nirmatrelvir, seguidas, na mesma direção, por eletrofisiologia relacionada ao hERG, carcinogenicidade, citotoxicidade em HEK293, hematotoxicidade e imunotoxicidade, e, na direção oposta, por toxicidade aguda sistêmica, atividade do receptor X de pregnano e sensibilização cutânea. Desfechos mitocondriais, endócrinos, de alvos neurais e oculares foram convergentes-negativos para ambos.

Duas observações qualificam toda comparação aqui apresentada. Primeiro, as saídas máximas e idênticas de genotoxicidade e micronúcleo obtidas para um inibidor covalente e um não covalente indicam que esses classificadores não respondem à ogiva eletrofílica de uma das moléculas, e portanto que o sinal mais forte do conjunto é o menos específico do composto. Segundo, a evidência experimental primária disponível para os dois compostos é marcadamente desigual, de modo que uma diferença entre seus perfis computacionais pode ser testada contra experimento em apenas um dos lados na maioria dos domínios, e em nenhum deles em vários casos. Nenhum dos compostos pode ser descrito como mais seguro que o outro com base nestes dados, e nenhuma predição aqui relatada constitui evidência de toxicidade clínica ou experimental confirmada.

As principais prioridades para investigação subsequente são, para ambos os compostos, testes independentes de genotoxicidade e micronúcleo e ensaios de função respiratória e em células das vias aéreas ancorados à exposição clínica; para o ensitrelvir especificamente, modelos hepatocitários de lesão e determinação direta de hERG por patch-clamp com cálculo de margem de exposição; e, novamente para ambos, modelos de células tubulares proximais renais avaliados em exposições representativas de comprometimento renal grave, ensaios hematológicos focados em coagulação e caracterização in vitro da ativação do receptor X de pregnano e do potencial de indução do citocromo P450 3A. Estudos nessas áreas esclarecerão quais das diferenças aqui observadas refletem a química das moléculas individuais e quais refletem o comportamento dos modelos de predição dentro de uma mesma classe de alvo.

Referências

1. Brewitz L, et al. Alkyne Derivatives of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors Including Nirmatrelvir Inhibit by Reacting Covalently with the Nucleophilic Cysteine. J Med Chem. 2023. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01627

2. Unoh Y, et al. Discovery of S-217622, a Noncovalent Oral SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor Clinical Candidate for Treating COVID-19. J Med Chem. 2022;65:6499-6512. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00117

3. Zeng X, et al. Molecular mechanism of ensitrelvir inhibiting SARS-CoV-2 main protease and its variants. Commun Biol. 2023;6:694. doi:10.1038/s42003-023-05071-y

4. Cox DS, et al. Effects of nirmatrelvir/ritonavir on midazolam and dabigatran pharmacokinetics in healthy participants. Br J Clin Pharmacol. 2023. doi:10.1111/bcp.15835

5. Sathish JG, Bhatt S, DaSilva JK, et al. Comprehensive Nonclinical Safety Assessment of Nirmatrelvir Supporting Timely Development of the SARS-CoV-2 Antiviral Therapeutic, Paxlovid. Int J Toxicol. 2022. doi:10.1177/10915818221095489

6. Catlin N, et al. Reproductive and developmental safety of nirmatrelvir (PF-07321332), an oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor in animal models. Reprod Toxicol. 2022;108:56-61.

7. Hammond J, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. N Engl J Med. 2022. doi:10.1056/NEJMoa2118542

8. Singh RSP, et al. Innovative Randomized Phase I Study and Dosing Regimen Selection to Accelerate and Inform Pivotal COVID-19 Trial of Nirmatrelvir. Clin Pharmacol Ther. 2022. doi:10.1002/cpt.2603

9. Toussi SS, et al. Pharmacokinetics of Oral Nirmatrelvir/Ritonavir, a Protease Inhibitor for Treatment of COVID-19, in Subjects With Renal Impairment. Clin Pharmacol Ther. 2022. doi:10.1002/cpt.2688

10. Shimizu R, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the Novel Antiviral Agent Ensitrelvir Fumaric Acid, a SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor, in Healthy Adults. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66:e00632-22. doi:10.1128/aac.00632-22

11. Katsube T, et al. Effect of Renal Impairment on Pharmacokinetics and Safety of Ensitrelvir, a SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitor. Infect Dis Ther. 2024;13:597-607. doi:10.1007/s40121-024-00946-x

12. Yotsuyanagi H, et al. Efficacy and Safety of 5-Day Oral Ensitrelvir for Patients With Mild to Moderate COVID-19: The SCORPIO-SR Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open. 2024;7:e2354991. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.54991

13. Luetkemeyer AF, et al. Ensitrelvir for the Treatment of Nonhospitalized Adults with COVID-19: Results from the SCORPIO-HR, Phase 3, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial. Clin Infect Dis. 2025.

14. Hayden FG, et al. Ensitrelvir for Covid-19 Postexposure Prophylaxis in Household Contacts. N Engl J Med. 2026;394:1905-1915. doi:10.1056/NEJMoa2509306

15. Sasaki M, et al. S-217622, a SARS-CoV-2 main protease inhibitor, decreases viral load and ameliorates COVID-19 severity in hamsters. Sci Transl Med. 2022. doi:10.1126/scitranslmed.abq4064

16. Fu L, Shi S, Yi J, et al. ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. Nucleic Acids Res. 2024;52(W1):W422-W431. doi:10.1093/nar/gkae236

17. Banerjee P, Kemmler E, Dunkel M, Preissner R. ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. Nucleic Acids Res. 2024;52(W1):W513-W520. doi:10.1093/nar/gkae303

18. Myung Y, de Sá AGC, Ascher DB. Deep-PK: deep learning for small molecule pharmacokinetic and toxicity prediction. Nucleic Acids Res. 2024;52(W1):W469-W475. doi:10.1093/nar/gkae254

19. Gu Y, Yu Z, Wang Y, et al. admetSAR3.0: a comprehensive platform for exploration, prediction and optimization of chemical ADMET properties. Nucleic Acids Res. 2024;52(W1):W432-W438. doi:10.1093/nar/gkae298

20. Sanches IH, Braga RC, Alves VM, Andrade CH. Enhancing hERG Risk Assessment with Interpretable Classificatory and Regression Models. Chem Res Toxicol. 2024;37(6):910-922. doi:10.1021/acs.chemrestox.3c00400

21. Zheng H, Zhan H. ChatGPT in Scientific Writing: A Cautionary Tale. Am J Med. 2023;136(8):725-726.e6. doi:10.1016/j.amjmed.2023.02.011

22. Agha RA, Mathew G, Rashid R, et al. Transparency in the Reporting of Artificial Intelligence - The TITAN Guideline. PJS. 2025. doi:10.70389/PJS.100082

23. Morais GCDF, Fulco UL, Da Silva ED, Oliveira CBSD, Oliveira JIN. Toxicological Potential of the FDA-Approved Treatment against Monkeypox. IJTM. 2023;3(2):183-186. doi:10.3390/ijtm3020013

24. Morais GCDF, Dantas Da Silva Junior E, Bruno Silva De Oliveira C, Rodrigues-Neto JF, Laino Fulco U, Ivan Nobre Oliveira J. Modafinil: A closer look at its theoretical toxicological potential. J Psychopharmacol. 2023;37(9):945-947. doi:10.1177/02698811231187127

25. Silva GVR, Aktaruzzaman M, Fulco UL, Alqahtani T, E A Zaki M, Oliveira JIN. Toxicological insights and safety considerations of vorasidenib in grade 2 astrocytoma and oligodendroglioma. Int J Surg. 2025;111(5):3685-3693. doi:10.1097/JS9.0000000000002356

26. De Farias Morais GC, Alves GB, Akter S, et al. Perampanel monotherapy in pediatric epilepsy: Emphasizing the need for comprehensive safety evaluation. Epilepsia Open. 2025;10(3):971-975. doi:10.1002/epi4.70031

27. Morais GCDF, Alves GB, Hossain MdS, Sindi ER, Zaki MEA, Oliveira JIN. Olaparib in pancreatic cancer: a computational study on safety and toxicological implications. Int J Surg. 2025;111(7):4914-4916. doi:10.1097/JS9.0000000000002523

Anexos



Figure 1. Comparative computational–evidence concordance map for ensitrelvir and nirmatrelvir. Each row names a toxicity domain together with the endpoint that represents it, and reports the output obtained for that endpoint in each compound under the ide



Figure 2. Joint toxicity domain prioritization map for ensitrelvir and nirmatrelvir. Domains are organized as shared validation priorities, ensitrelvir-specific priorities, nirmatrelvir-specific priorities, or deprioritized and not covered by the computat



Table 1. Prioritized endpoint-level in silico toxicity predictions for ensitrelvir and nirmatrelvir under an identical panel.



Supplementary_Table_S1_ensitrelvir_nirmatrelvir

CÓDIGO: SB1342

AUTOR: KAYLANE DOS ANJOS NUNES

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Dinâmica espaço-temporal da pesca atuneira e do do atum-albacora (Thunnus alalunga, Bonnaterre, 1788) no Atlântico Sul.

Resumo

O atum-albacora apresenta uma ampla distribuição e um importante papel como predadores de topo, eles também desempenham uma função ecológica fundamental nos ecossistemas pelágicos, contribuindo para a manutenção do equilíbrio trófico marinho. Neste estudo, foram utilizados dados de pesca de espinhel de *Thunnus alalunga* no Oceano Atlântico Sul, abrangendo o período de 1980 a 2016. Os dados foram submetidos a etapas de organização, limpeza e análise exploratória, considerando informações sobre esforço pesqueiro, distribuição espacial, frotas e captura. Os resultados evidenciaram variações temporais e espaciais na atividade da frota atuneira, bem como mudanças na distribuição e na abundância do atum-albacora ao longo da série histórica. Também foram identificadas diferenças entre as frotas participantes, principalmente quanto ao esforço pesqueiro e às estratégias de pesca, incluindo o número de anzóis utilizados e o horário de lançamento do espinhel. Os padrões identificados fornecem uma base inicial para compreender a dinâmica espaço-temporal do T. alalunga e, posteriormente, investigar a influência de preditores ambientais sobre sua distribuição e abundância. Dessa forma, os dados provenientes da atividade pesqueira constituem uma fonte potencialmente útil para análises da dinâmica dos atuns em diferentes escalas espaço-temporais, desde que consideradas as limitações inerentes aos dados e à atividade da frota.

Palavras-chave: Ecologia pesqueira; Manejo ecossistêmico; Pesca de espinhel.

TITLE: Spatio-temporal dynamics of the tuna fishery and albacore tuna (Thunnus alalunga, Bonnaterre, 1788) in the South Atlantic Ocean.

Abstract

Albacore tuna has a wide distribution and plays an important role as a top predator, performing a fundamental ecological function in pelagic ecosystems and contributing to the maintenance of marine trophic balance. In this study, longline fishing data for *Thunnus alalunga* in the South Atlantic Ocean were used, covering the period from 1980 to 2016. The data underwent organization, cleaning, and exploratory analysis, considering information on fishing effort, spatial distribution, fleets, and catches. The results revealed temporal and spatial variations in tuna fleet activity, as well as changes in the distribution

and abundance of albacore tuna throughout the historical series. Differences among participating fleets were also identified, particularly regarding fishing effort and fishing strategies, including the number of hooks used and the timing of longline deployment. The patterns identified provide an initial basis for understanding the spatiotemporal dynamics of *T. alalunga* and for subsequently investigating the influence of environmental predictors on its distribution and abundance. Thus, fisheries-derived data constitute a potentially useful source for analyzing tuna dynamics across different spatiotemporal scales, provided that the limitations inherent to the data and fleet activity are taken into account.

Keywords: Fisheries ecology; Ecosystem-based management; Longline fishing.

Introdução

Os atuns são organismos altamente migratórios e circunglobais, amplamente distribuídos pelos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (Majkowski, 2007; Coulter et al., 2020). Além de sua importância ecológica como predadores de topo de cadeia, esses organismos são intensamente explorados em escala global, atingindo capturas recordes de 8,3 milhões de toneladas em 2022 (FAO, 2024). Dada a sua importância socioeconômica, esses recursos desempenham papel fundamental na segurança alimentar de diversas regiões do mundo (Lucena-Frédou, 2021).

No Atlântico Sul, cujos estoques são regulamentados pela ICCAT, parte considerável da captura desses recursos advém da pesca industrial, em particular da frota que opera com espinhel (Majkowski, 2007). Embora os principais estoques sejam monitorados, seu manejo ainda é realizado em nível populacional, ignorando a relação de sua dinâmica com o ambiente e o espaço marinho em que ocorrem. Essa questão é particularmente relevante para espécies com elevada capacidade migratória, cuja distribuição e abundância estão fortemente associadas às condições oceanográficas. Variáveis como temperatura da água e profundidade da camada de mistura podem influenciar diretamente a distribuição, a disponibilidade de habitat e os padrões de ocorrência dos tunídeos, tornando-os potencialmente susceptíveis às alterações ambientais decorrentes das mudanças climáticas (Erauskin-Extramiana et al., 2019; Coulter et al., 2020).

Dada a forte relação desses estoques com variáveis oceanográficas, é de se esperar que alterações decorrentes do aquecimento global afetem a abundância e a distribuição dos tunídeos (Erauskin-Extramiana et al., 2019; Coulter et al., 2020). Essa relação evidencia a necessidade de abordagens de gestão que transcendam a perspectiva centrada apenas na dinâmica populacional e incorporem as interações entre os componentes ecológicos, ambientais e socioeconômicos que caracterizam os sistemas pesqueiros, tal como previsto na abordagem ecossistêmica de manejo pesqueiro (EBFM, do inglês Ecosystem-Based Fisheries Management) (Zhou et al., 2010; Long et al., 2015; Benson & Stephenson, 2018).

Nesse cenário, destaca-se o atum-albacora (*T. alalunga*), uma das espécies de maior valor comercial nas embarcações de espinhel desde 1980 (FAO, 2014). O albacora apresenta características fisiológicas e ecológicas estreitamente relacionadas às condições ambientais do oceano, o que pode influenciar seus padrões de distribuição e abundância. A desova ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, associada a temperaturas superficiais do mar superiores a 24 °C, de modo que as condições ambientais durante os estágios iniciais de desenvolvimento podem influenciar a sobrevivência e, consequentemente, a abundância do estoque (Schaefer, 2001; Gillett, 2013).

Diante desse contexto, o uso de Modelos de Distribuição de Espécies (SDM) tem se tornado uma ferramenta essencial para avaliar como as espécies respondem aos condicionantes ambientais e identificar padrões de distribuição (Franklin, 2010). Ao integrar informações sobre a ocorrência ou abundância das espécies com variáveis ambientais, os SDMs permitem estimar a associação entre sua distribuição e os gradientes ambientais, além de produzir predições espaciais de ocorrência (Austin, 2002). O uso de SDMs para o atum-albacora pode, portanto, contribuir para compreender sua dinâmica espaço-temporal e identificar como a variação nas condições ambientais está relacionada à sua abundância e distribuição.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a dinâmica espaço-temporal da frota atuneira e do atum-albacora no Atlântico Sul, caracterizando os padrões de distribuição e variação da atividade pesqueira e sua relação com a ocorrência e abundância do atum-albacora. Em paralelo, o projeto objetiva aplicar modelos de distribuição de espécies, com o intuito de identificar as principais variáveis ambientais e operacionais da pesca associadas a dinâmica de *T. alalunga.*

Metodologia

Área de estudo

A área de estudo compreende o Oceano Atlântico Sul (OAS), entre 5°N e 60°S e 20°L e 70°W (Figura 1), sendo influenciada principalmente pela dinâmica dos ventos alísios e por zonas de convergência atmosférica. Entre os principais fenômenos destacam-se a Zona de Convergência Subtropical do Atlântico Sul (ZCSAS) e a Zona de Convergência Intertropical (ZCIT), que apresentam variações sazonais e influenciam diretamente as condições de temperatura, salinidade e precipitação da região (Escobar, 2020).

A circulação superficial do OAS é dominada pelas correntes Sul Equatorial (CSE), do Brasil (CB), Norte do Brasil (CNB) e das Malvinas (CM). A CSE contribui para a formação da CB e da CNB, enquanto a CB e a CM se encontram na região próxima a 33°S, formando a Confluência Subtropical do Atlântico Sul (CSAS), uma área de elevada dinâmica oceanográfica (Tchernia,1980; Olson et al., 1994; Stramma e England, 1999; Ciotti et al., 1995). Além da circulação superficial, o OAS recebe influência de massas de água provenientes do Atlântico Norte, Pacífico e Mar de Weddell, destacando-se a Água Profunda do Atlântico Norte (NADW), caracterizada por elevada salinidade e concentração de oxigênio e baixa disponibilidade de nutrientes (Reid, 1989; Pinet, 2003).

Dados Pesqueiros

Neste estudo foram analisados os dados resultantes da pesca de espinhel que operou no Atlântico Sul entre os anos de 1980 a 2016, por meio de embarcações nacionais e arrendadas (Figura 2). O conjunto de dados foi obtido através da Comissão Internacional para a Conservação do Atum Atlântico (ICCAT), derivados dos diários de bordo cuja informação é agregada em quadrantes espaciais de 1° x 1°. Esses dados reúnem informações operacionais da pesca (e.g., localidade, esforço pesqueiro, tempo de imersão, etc.), bem como informações biológicas da captura de espécies alvos e não-alvos da pesca (em número de indivíduos). Dentre as espécies presentes no banco de dados, foi selecionada a espécie *Thunnus alalunga* devido a sua maior abundância ao longo de toda a série histórica. Para assegurar a qualidade dos dados e mitigar inconsistências, foi aplicado um protocolo de filtragem ao banco de dados de forma a remover informações

inconsistentes, incompletas e/ou potencialmente erradas. Assim, foram removidos registros que apresentaram: (i) registros duplicados, (ii) embarcações sem identificação de seu país de origem, (iii) frotas com registros de apenas uma pescaria em toda a série histórica, ou que apresentaram menos que 5 pescarias em um ano, (iv) pescarias em que a abundância ultrapassava o número total de anzois, registros que apresentaram inconsistências no formato de hora, fruto de erros de digitação, e por fim, (v) pescarias cujas coordenadas estavam associadas ao ambiente terrestre ou regiões geograficamente isoladas do núcleo de atuação das frotas. No total, o banco de dados reuniu informações de 87.421 pescarias distribuídas entre 20 países.

Dados Ambientais

Nos modelos de distribuição de espécies, é importante definir quais os preditores ambientais serão utilizados de acordo com a biologia e comportamento da espécie. Conforme destacado na Tabela 1, serão consideradas um conjunto de 14 variáveis oceanográficas que contemplam diferentes aspectos das condições ambientais potencialmente relevantes para a distribuição do atum-albacora.
Estas variáveis foram divididas em duas categorias: (i) variáveis estáticas, cujos valores não variam ao longo do período analisado (i.e., batimetria), e (ii) variáveis dinâmicas, que apresentam variação temporal (todas as demais variáveis). As variáveis dinâmicas foram baixadas pelo Copernicus Marine Service (https://data.marine.copernicus.eu/products), enquanto que a variável estática foi obtida a partir do modelo batimétrico fornecido pelo global General Bathymetric Chart of the Oceans (GEBCO;https://www.gebco.net/). Em conjunto, essas variáveis compõem uma base de dados ambientais de mais de 84 GB de informações georreferenciadas, as quais ainda precisam ser processadas e integradas ao banco de dados pesqueiros.

Análise de Dados - Dinâmica temporal

A dinâmica da frota foi avaliada espacialmente e temporalmente em relação ao esforço pesqueiro, medido pelo número de anzol utilizado em cada pescaria. Para a análise temporal, agregaram-se as pescarias a nível anual, sendo avaliado tanto o esforço médio quanto o total ao longo da série histórica. Além disso, analisamos como o esforço pesqueiro foi distribuído entre as diferentes nações participantes da pesca atuneira .
Para avaliar a dinâmica do atum-albacora, as capturas, expressas em número de indivíduos, foram padronizadas pelo esforço pesqueiro em cada pescaria (i), conforme relação: CPUEi=(Capturai / N°anzoli)*1000. Essa padronização foi necessária para corrigir as variações no esforço amostral entre as operações de pesca. Subsequentemente, agregaram-se as capturas padronizadas de forma análoga à análise dinâmica da frota.

Análise de Dados - Dinâmica espacial

Para avaliar a dinâmica espacial da frota pesqueira e do atum-albacora no Atlântico Sul, subdividiu-se a área de estudo em uma malha regular com resolução espacial de 2,5×2,5°. Os registros de esforço pesqueiro (número de anzóis) e os valores de CPUE foram então associados às células do grid para delimitar as zonas de maior atuação da frota e as áreas de agregação da espécie no Atlântico Sul.
Foi realizada inicialmente uma agregação considerando toda a série histórica para retratar a distribuição espacial acumulada do esforço e da produtividade do atum-albacora na área de estudo. Posteriormente, para detectar tendências de expansão, retração ou

deslocamento geográfico das pescarias e da espécie, agregaram-se os dados por década, considerando os períodos de 1980-1989, 1990-1999, 2000-2009 e 2010-2016. Para cada década, foram calculados os valores agregados de esforço e CPUE em cada célula do grid, permitindo comparar a distribuição espacial da atividade da frota.

Resultados e Discussões

Dinâmica espaço-temporal da frota atuneira

Ao longo da série histórica analisada, foram identificados 20 países participantes da pesca atuneira, dos quais somente 17 apresentaram registros de captura para T. alalunga, totalizando 376 embarcações distintas. A participação das diferentes frotas apresentou variação ao longo do período, o que evidencia a diferença na contribuição dos países para a atividade pesqueira (Fig. 5). Conforme destacado na Figura 3, o Brasil (BRA), Espanha (ESP), Japão (JAP), Taiwan (TAI) e São Vincente e Granadinas (VCT) foram as nações mais participativas em termos de número de pescarias e esforço pesqueiro (Fig. 3).

As duas primeiras décadas da série histórica foram marcadas por um menor número de embarcações e de anzóis, fato este que caracteriza o período de desenvolvimento desta atividade pesqueira no oceano Atlântico Sul (Hazin, 2005) (Fig. 4). A partir de meados da década de 1990, observa-se um aumento gradativo do esforço pesqueiro, com um pico entre 1999 e 2001, quando foram registrados os maiores valores tanto para o número de embarcações quanto para o número de anzóis. Esse aumento na atividade pesqueira pode ser justificado pela origem do Departamento de Pesca e Aquicultura - DPA, atualmente o Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, que determinou políticas de arrendamento exigidas pelo governo brasileiro no ano de 1998 (Hazin, 2005). Adicionalmente, o declínio de alguns estoques de grandes peixes pelágicos em oceanos adjacentes pode ter contribuído para o deslocamento de embarcações e o consequente aumento da atividade pesqueira na área de estudo (Hazin et al., 2004). Após o pico observado no início dos anos 2000, verifica-se uma redução progressiva do esforço até meados da década, seguida por oscilações nos anos subsequentes.

Embora as frotas atuem utilizando o espinhel como método de pesca, observam-se diferenças nas estratégias empregadas, especialmente quanto ao número de anzóis utilizados, à profundidade de lançamento do espinhel e ao horário de lançamento. Entre essas características, o horário de lançamento apresentou uma tendência marcante, uma vez que 72,44% dos registros com maior número de anzóis ocorreram durante o período noturno. Ao atentar para o número médio de anzóis, observou-se elevada variabilidade no esforço pesqueiro médio ao longo da série temporal. Considerando todas as nações em conjunto, foram observados picos interanuais principalmente entre 1980 e 1995, enquanto, a partir dos anos 2000, o esforço pesqueiro apresentou maior estabilidade e permaneceu, em geral, abaixo da média da série (Fig. 5). Esse padrão, no entanto, foi marcado por diferenças marcantes entre as cinco nações mais participativas, sugerindo distintas estratégias de pesca e realçando diferentes períodos de participação na pescaria do atum-albacora.

O Brasil, que ao longo da série histórica sempre esteve presente, apresentou uma tendência relativamente estável, com valores do número médio de anzóis permanecendo

notoriamente abaixo da média geral. O Japão, por outro lado, apresentou tendência de aumento ao longo do período analisado, mantendo valores acima da média em grande parte da série e atingindo os maiores valores de esforço no início dos anos 2000. A Espanha, contudo, apresentou um comportamento distinto, com elevado esforço pesqueiro no início de sua participação, seguidos por uma redução e posterior estabilização em níveis mais baixos. Taiwan e São Vicente também apresentaram valores elevados de número médio de anzóis, com picos interanuais mais acentuados e valores predominantemente superiores à média geral durante os períodos em que estiveram presentes na série. Embora Brasil e Japão tenham participado da pescaria por períodos mais longos, Espanha, Taiwan e São Vicente apresentaram participação mais restrita temporalmente, porém com maior esforço médio, especialmente Taiwan e São Vicente (Fig. 5).

Em termos de distribuição espacial do esforço pesqueiro, observa-se que as frotas ocuparam de forma relativamente uniforme grande parte do Atlântico Sul quando agrupando todos os registros da série temporal (Fig. 6). Entretanto, a análise por décadas evidenciou mudanças na distribuição espacial da frota ao longo do período analisado (Fig. 6). Na década de 1980, observa-se um esforço mais homogêneo ao longo de uma pequena área de atuação. Nas décadas seguintes, especialmente nos anos 2000, observa-se uma expansão da área ocupada pela frota, com a distribuição do esforço estendendo-se para regiões mais afastadas da costa e apresentando maior cobertura espacial do Atlântico Sul (Fig. 6).

A expansão espacial observada ao longo da série histórica pode estar relacionada às transformações ocorridas na atividade pesqueira e à adoção de equipamentos e estratégias que possibilitaram ampliar a permanência das embarcações no mar e explorar áreas além das regiões tradicionalmente utilizadas pela frota (Hazin et al., 2000). Esse processo também pode estar associado ao desenvolvimento gradual do conhecimento sobre a distribuição e as áreas de agregação do atum-albacora. Segundo Zagaglia (2003), a pesca direcionada para o *T. alalunga* não estava totalmente integrada à frota brasileira, apresentando participação importante de embarcações estrangeiras arrendadas. Desse modo, a mudança observada na distribuição espacial do esforço entre as décadas de 1980 e 2000, pode estar relacionada à expansão e à maior diversificação espacial da atividade da frota brasileira.

Dinâmica espaço-temporal do atum-albacora

Em consonância com o esforço pesqueiro, as nações que registraram o maior número de pescarias também lideraram as maiores capturas de T. alalunga, i.e., Brasil (BRA), Espanha (ESP), São Vicente e Granadinas (VCT), Japão (JAP) e Taiwan (TAI) (Fig. 7). Os valores acumulados de CPUE permaneceram relativamente baixos durante a primeira metade da série temporal, com aumento gradual ao final da década de 1990 e um pico expressivo no início da década de 2000. Após esse pico, observa-se uma tendência de redução na captura do atum-albacora, com valores relativamente baixos e estáveis após 2003. Ao considerar a dinâmica temporal da captura média, observa-se capturas relativamente baixas e estáveis ao longo de toda série histórica, com um pico de captura em 1993 (Fig. 8). A redução observada entre 1994 e 1997, contudo, não deve ser necessariamente interpretada como uma diminuição na abundância de *T. alalunga*, uma vez que Frédou (2007) associa esse período a uma mudança na estratégia de pesca, caracterizada pelo redirecionamento da atividade para o atum-obeso (Thunnus obesus).

Dessa forma, a variação na captura de *T. alalunga* nesse período pode refletir, ao menos parcialmente, alterações na estratégia e no direcionamento do esforço pesqueiro, e não exclusivamente mudanças na dinâmica do estoque. Entretanto, é importante ressaltar que este padrão está sendo parcialmente mascarado, uma vez que há uma expressiva variabilidade na captura anual.

No que diz respeito à distribuição espacial da abundância do *T. alalunga*, os resultados indicaram duas principais áreas de agregação quando considerado os dados de toda a série temporal (Fig. 9). As regiões sudoeste e nordeste do Atlântico Sul mostraram-se particularmente produtivas. Quando analisado por décadas, observou-se um deslocamento e retração espaço-temporal do atum-albacora. Nas décadas de 1980 e 1990, o atum-albacora apresentou ampla distribuição na área de estudo, acompanhando o aumento do esforço pesqueiro observado nesse período. Entretanto, nas duas décadas seguintes observou-se uma marcada redução de sua distribuição, com as maiores abundâncias concentradas ao longo da costa brasileira e na porção mais ao sul do Atlântico Sul (Figs. 6 e 9).

Conclusão

Os resultados obtidos até o momento permitiram caracterizar a dinâmica espaço-temporal da frota espinheleira e do atum-albacora (*Thunnus alalunga*) no Atlântico Sul ao longo de uma série histórica de 37 anos (1980-2016). A atividade pesqueira apresentou notória variações ao longo do período analisado, com aumento do esforço registrado principalmente a partir da década de 1990 e maior intensidade no início dos anos 2000. Também foram observadas diferenças entre as principais nações participantes quanto ao período de atuação e às estratégias de pesca utilizadas. Em termos espaciais, foi constatado uma expansão da área de atuação da frota ao longo das décadas, o que evidencia mudanças na distribuição do esforço pesqueiro na região estudada.

A dinâmica do *T. alalunga* acompanhou, em parte, as variações observadas no esforço pesqueiro, com aumento gradual na captura a partir da década de 1990 e pico de captura sendo registrado no ano de 2000. A análise espacial revelou duas principais áreas de agregação, localizadas nas porções nordeste e sudoeste do Atlântico Sul. A análise temporal também indicou mudanças na distribuição espacial da espécie, com ampla ocorrência nas duas primeiras décadas da série histórica, e posterior retração e concentração das maiores abundâncias em regiões próximas à costa brasileira e na porção mais ao sul da área de estudo. O conjunto de resultados apresentados evidenciam uma elevado dinamismo da atividade pesqueira e do atum-albacora, reforçando, portanto, a importância de considerar a dimensão espacial e as variações temporais na compreensão e manejo desse recurso pesqueiro.

Vale destacar que os resultados apresentados neste relatório são preliminares e correspondem à etapa descritiva de um projeto ainda em andamento, desenvolvido no âmbito do meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). A próxima etapa da pesquisa compreenderá a aplicação de Modelos de Distribuição de Espécies (SDMs), para os quais os dados de captura e esforço pesqueiro serão integrados às variáveis ambientais já obtidas. Dessa forma, a análise dos SDMs permitirá complementar os resultados

descritivos aqui apresentados e aprofundar a compreensão da relação entre a dinâmica da pesca, a distribuição da espécie e as condições ambientais no Atlântico Sul. Os resultados completos do projeto, incluindo a etapa de modelagem, serão apresentados na defesa do TCC, prevista para dezembro de 2026.

Referências

Austin, M. P. (2002). Spatial prediction of species distribution: An interface between ecological theory and statistical modelling. Ecological Modelling, 157, 101–118.

Benson, A. J., & Stephenson, R. L. (2018). Options for integrating ecological, economic, and social objectives in evaluation and management of fisheries. Fish and Fisheries, 19(1), 40–56.

Ciotti, A. M., Odebrecht, C., Fillmann, G., & Möller, O. O., Jr. (1995). Freshwater outflow and Subtropical Convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. Continental Shelf Research, 15, 1737–1756.

Clarke, S., Sato, M., Small, C., Sullivan, B., Inoue, Y., & Ochi, D. (2014). Bycatch in longline fisheries for tuna and tuna-like species: A global review of status and mitigation measures (FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 588). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Coulter, A., Cashion, T., Cisneros-Montemayor, A. M., Popov, S., Tsui, G., Le Manach, F., & Pauly, D. (2020). Using harmonized historical catch data to infer the expansion of global tuna fisheries. Fisheries Research, 221, 105379.

Erauskin-Extramiana, M., Arrizabalaga, H., Hobday, A. J., Cabré, A., Ibaibarriaga, L., Arregui, I., & Chust, G. (2019). Large-scale distribution of tuna species in a warming ocean. Global Change Biology, 25(6), 2043–2060.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). The state of world fisheries and aquaculture 2024: Blue transformation in action. https://doi.org/10.4060/cd0683en.

Franklin, J. (2010). Mapping species distributions. Cambridge University Press.

Frédou, F. L., Frédou, T., Travassos, P., Lins, J., Arfelli, C., Andrade, H. A., & Hazin, F. (2007). Distribution, catch and length composition of the albacore tuna (Thunnus alalunga) caught by the tuna longline fishery in the South Atlantic Ocean. Collective Volume of Scientific Papers ICCAT, 60(2), 518–526.

Gillett, R. (2013). Tuna for tomorrow (Working Paper No. 11). Indian Ocean Commission, SmartFish Programme.

Hazin, F. H. V., Broadhurst, M. K., & Hazin, H. G. (2000). Preliminary analysis of the feasibility of transferring new longline technology to small artisanal vessels off northeastern Brazil. Marine Fisheries Review, 62, 27–34.

Hazin, H. G., Hazin, F. H., & Travassos, P. (2004). Xiphias gladius. In R. P. Lessa, M. F. Nóbrega, & J. L. Bezerra Junior (Eds.), Dinâmica de populações e avaliação de estoques dos recursos pesqueiros da Região Nordeste: Programa de Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva (REVIZEE), Subcomitê Regional Nordeste (SCORE-NE): Relatório síntese (Vol. II, pp. 224–236).

Hazin, Humberto Gomes. Influência das variáveis oceanográficas na dinâmica populacional e na pesca do espadarte, Xiphias gladius Linnaeus 1758, capturados pela frota brasileira. 2005. Doutorado em Ciências do Mar – Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Algarve, 2005.

International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas. (2025). Catches by year and species in tons. https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNzFmYTg4NmEtNDhjNy00NWUxLThhZjYtNzRjMmI4MjJiODUwIiwidCI6IjQzYWUxY2NmLTA0NGYtNDAxMy1hNzUwLWZjNWQ2NjAwMTlmYSIsImMiOjl9.

Long, R. D., Charles, A., & Stephenson, R. L. (2015). Key principles of marine ecosystem-based management. Marine Policy, 57, 53–60.

Majkowski, J. (2007). Global fishery resources of tuna and tuna-like species.

Morrison, D. C., Laurs, R. M., & Ulevitch, R. C. (1978). Activity of albacore serum complement reflects its thermoregulatory capacity. In G. D. Sharp & A. E. Dizon (Eds.), The physiological ecology of tunas (pp. 141–150). Academic Press.

Olson, D. B., Hitchcock, G. L., Mariano, A. J., Ashjian, C. J., Peng, G., Nero, R. W., & Podesta, G. P. (1994). Life on the edge: Marine life and fronts. Oceanography, 7, 52–60.

Pinet, P. R. (2003). Invitation to oceanography (3rd ed.). Jones and Bartlett Publishers.

R Core Team. (2026). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/.

Reid, J. L. (1989). On the total geostrophic circulation of the South Atlantic Ocean: Flow patterns, tracers, and transports. Progress in Oceanography, 23(3), 149–244.

Schaefer, K. M. (2001). Reproductive biology of tunas. Fish Physiology, 19, 225–270.

Stramma, L., & England, M. (1999). On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean. Journal of Geophysical Research: Oceans, 104, 20863–20883.

Tchernia, P. (1980). Descriptive regional oceanography. Pergamon Press.

Torres-Irineo, E., et al. (2014). Bycatch species composition over time by tuna purse-seine fishery in the eastern tropical Atlantic Ocean. Biodiversity and Conservation, 23(5), 1157–1173.

Zagaglia, C.R., 2003. Técnicas de sensoriamento remoto aplicadas à pesca de atuns no Atlântico Oeste Equatorial. Tese de Mestrado. INPE, SJC., São Paulo, p. 183.

Zhou, S., Smith, A. D. M., Punt, A. E., Richardson, A. J., Gibbs, M., Fulton, E. A., Pascoe, S., Bulman, C., Bayliss, P., & Sainsbury, K. (2010). Ecosystem-based fisheries management requires a change to the selective fishing philosophy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(21), 9485–9489.

Anexos



Figura 1: Área de estudo determinada entre 5°N e 60°S subdividida em duas áreas. AT-SW compreende o Oceano Atlântico sul leste (AT-SE) e o Oceano atlântico sul oeste (AT-SW).



Figura 2: Pesca pelo método de espinhel. Fonte: King (2007, p. 145)



Tabela 1: Preditores ambientais que serão considerados nos modelos de distribuição do atum-albacora, a coluna U representa a unidade de cada variável.



Figura 3: Distribuição do esforço pesqueiro acumulado entre as 17 nações atuantes na pesca do atum-albacora, expressa pelo número total de embarcações e pelo número total de anzóis utilizados.



Figura 4: Dinâmica temporal do esforço pesqueiro, medido tanto em número total de anzóis (painel superior) quanto número total de pescarias (painel inferior).



Figura 5: Dinâmica temporal do esforço pesqueiro médio. Cada linha colorida representa a média anual e as áreas sombreadas correspondem ao desvio-padrão (±1 DP). A linha tracejada indica a média geral do número de anzóis ao longo da série histórica.



Figura 6: Distribuição espacial do esforço pesqueiro médio no Atlântico Sul, considerando toda a série histórica (Geral), bem como sua variação ao longo das décadas.



Figura 7: Gráfico da CPUE total (x1000) de cada país.



Figura 8: Comparação entre a CPUE Total e CPUE média (+- desvio padrão) ao longo de toda a série histórica.



Figura 9: Distribuição espacial do CPUE média no Atlântico Sul, considerando toda a série histórica (Geral), bem como sua variação ao longo das décadas.

CÓDIGO: SB1345

AUTOR: MARIA JORDANA PEGADO QUEIROZ DE CASTRO

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Estabelecimento de protocolo para imunofenotipagem por citometria de fluxo dos marcadores CD4 e IFN-y em camundongos BALB/c com câncer de mama: análises hematológicas e bioquímicas associadas

Resumo

O câncer de mama é uma das principais causas de mortalidade entre mulheres, e sua progressão relaciona-se a alterações sistêmicas, incluindo a resposta imunológica. Este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de imunofenotipagem por citometria de fluxo para CD4 e IFN-y; em camundongos BALB/c com câncer de mama, associado à caracterização hematológica e bioquímica, comparando animais saudáveis e animais tratados com NPCG-TEX46-Poly(I:C) + NP4T1DOX, vacina de nanopartículas de goma de caju adjuvada com Poly(I:C) associada à doxorrubicina nanoencapsulada. Fêmeas foram inoculadas com células 4T1, enquanto machos saudáveis serviram de controle para a imunofenotipagem; ao 28º dia, foi realizada coleta sanguínea para dosagens bioquímicas (ureia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT), hemograma e imunofenotipagem. Os parâmetros renais mantiveram-se na faixa de referência para fêmeas saudáveis, e a AST ficou próxima ao limite superior, sem dano hepatocelular. O leucograma revelou leucocitose acentuada, com neutrofilia e monocitose, compatível com estado inflamatório sistêmico. A imunofenotipagem mostrou frequências semelhantes de CD4+ e IFN-y+ entre tratados e saudáveis, mas com aumento expressivo da população duplo positiva CD4+/IFN-y+ nos tratados, indicando mudança qualitativa no perfil Th1. Os achados sugerem resposta imune direcionada, com perfil de segurança renal e hepático adequado.

Palavras-chave: Palavras-chave: Câncer de mama; Citometria de fluxo; Linfócitos T CD4+

TITLE: Establishment of a flow cytometry immunophenotyping protocol for CD4 and IFN-y; markers in BALB/c mice with breast cancer: Associated hematological and biochemical analyses.

Abstract

Breast cancer is one of the leading causes of mortality among women, and its progression is associated with systemic alterations, including the immune response. This study aimed to establish a flow cytometry immunophenotyping protocol for CD4 and IFN-y in BALB/c mice with breast cancer, associated with hematological and biochemical characterization, comparing healthy animals and animals treated with NPCG-TEX46-Poly(I:C) + NP4T1DOX, a cashew gum nanoparticle vaccine adjuvanted with Poly(I:C) combined with nanoencapsulated doxorubicin. Females were inoculated with 4T1 cells, while healthy males served as controls for immunophenotyping; on day 28, blood was collected for biochemical assays (urea, creatinine, uric acid, AST, ALT), complete blood count, and immunophenotyping. Renal parameters remained within the reference range for healthy females, and AST was close to the upper limit, without hepatocellular damage. The leukogram showed marked leukocytosis, with neutrophilia and monocytosis, consistent with a systemic inflammatory state. Immunophenotyping showed similar CD4+ and IFN-y+ frequencies between treated and healthy animals, but with a marked increase in the CD4+/IFN-y+ double-positive population in treated animals, indicating a qualitative shift toward a Th1 profile.

Keywords: Keywords: Breast cancer; Flow cytometry; CD4+ T lymphocytes

Introdução

O câncer de mama é uma das principais causas de mortalidade entre mulheres no mundo, representando relevante problema de saúde pública devido à sua elevada incidência e heterogeneidade biológica [1,2]. Sua progressão relaciona-se não apenas a alterações intrínsecas das células tumorais, mas também a modificações sistêmicas, incluindo a resposta imunológica [3], o que reforça a necessidade de investigar a doença de forma integrada. Entre os componentes da imunidade antitumoral, os linfócitos T CD4+ participam da ativação de células dendríticas convencionais do tipo 1 (cDC1s), favorecendo respostas citotóxicas [4], enquanto a polarização Th1 potencializa mecanismos efetores de controle tumoral [5]. Dentre suas moléculas efetoras, o interferon-gama (IFN-y) destaca-se por inibir subpopulações de células-tronco tumorais em modelos murinos [6] e por associar-se a aspectos prognósticos em câncer de mama hormônio-dependente [7]. Assim, a avaliação conjunta de CD4+ e IFN-y contribui para compreender a resposta imune antitumoral. Além da imunidade celular, o desenvolvimento tumoral provoca alterações sistêmicas detectáveis por parâmetros hematológicos e bioquímicos [8], sendo os valores de referência para camundongos BALB/c importante suporte para diferenciar alterações relacionadas à doença da variabilidade fisiológica da linhagem [9,10]. A citometria de fluxo permite detectar simultaneamente marcadores de superfície e intracelulares em nível de célula única, já tendo sido empregada na identificação de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-y [10], desde que padronizadas etapas como marcação de superfície, permeabilização, bloqueio de secreção de citocinas e controles apropriados. Contudo, ainda são limitados os protocolos padronizados para avaliação integrada de CD4 e IFN-y em modelos murinos de câncer de mama associados à caracterização hematológica e bioquímica, o que pode comprometer a reprodutibilidade dos resultados. Nesse cenário, nanopartículas de goma de caju (Anacardium occidentale),

polissacarídeo natural biocompatível (NPCG), têm sido empregadas como matriz vacinal capaz de veicular antígenos tumorais, como o peptídeo TEX46 , formando o composto NPCG-TEX46 [11]. Para potencializar essa resposta, o Poly(I:C), agonista de TLR3, estimula a maturação de células dendríticas e a polarização Th1, aumentando a produção de IFN-y [12], enquanto a associação com quimioterápicos nanoencapsulados, como a doxorrubicina (NP4T1DOX) [13], pode induzir morte celular imunogênica de forma sinérgica. Assim, o presente estudo comparou animais de dois grupos terapêuticos: animais saudáveis e NPCG-TEX46-Poly(I:C) + NP4T1DOX, associando vacina adjuvada e quimioterapia, a fim de avaliar se essa combinação potencializa a resposta mediada por CD4+ e IFN-γ e seus reflexos hematológicos e bioquímicos em modelo murino de câncer de mama. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estabelecer e padronizar um protocolo de imunofenotipagem por citometria de fluxo para identificação e avaliação de CD4 e IFN-y em camundongos BALB/c portadores de câncer de mama, associado à caracterização hematológica e bioquímica, comparando animais saudáveis e animais tratados com a nanopartícula de caju.

Metodologia

Síntese e caracterização da nanopartícula de goma de caju

A goma de caju foi obtida da EMBRAPA e oxidada para obtenção da goma de caju oxidada (GCOX). O peptídeo tumoral TEX46 foi sintetizado pela Aminotech, enquanto o Poly(I:C) foi adquirido da Thermo Fisher Scientific. Os sistemas GCOX-TEX46 e GCOX-Poly(I:C) foram sintetizados por reação de Schiff e combinados para formar GCOX-TEX46-Poly(I:C), posteriormente liofilizado e caracterizado quanto às propriedades físico-químicas e morfológicas.

Animais utilizados

Os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Medicina Tropical da UFRN e mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal em Farmacologia da Inflamação e Investigação do Câncer (LAFINC) de acordo com os princípios éticos para experimentação animal. O projeto em que esse estudo está inserido foi aprovado pela CEUA/UFRN pelo n. 344.026/2023. Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas, da espécie Mus musculus, com 8 semanas de idade e pesando entre 21 e 28 gramas, para o modelo de indução tumoral. Os animais foram alojados em gaiolas a 22°C, com ventilação filtrada individual e exaustão automatizada com capacidade para 30 trocas de ar por hora, mantendo-os em ciclo claro/escuro de 12 horas. A nutrição animal foi estabelecida de forma que a água e comida foram livremente acessíveis durante todo o período de experimentação.

Indução tumoral e grupos experimentais

Para a indução tumoral in vivo foi realizada inoculação intraperitoneal de 1x106 células tumorais da linhagem 4T1 em cada animal fêmea. Os animais foram divididos em 2 grupos: Grupo 1 (saudáveis machos) utilizados na

imunofenotipagem, Grupo 2 (NPCG-TEX46-Poly(I:C) + NP4T1DOX, fêmeas). Os animais de ambos os grupos foram submetidos a um período de jejum de 2 horas, em logo em seguida foram eutanasiados ao 28º dia de experimento.

Coleta sanguínea

Para a coleta sanguínea os animais foram anestesiados com injeção intra-abdominal de xilazina (20 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) seguindo todos os parâmetros éticos em experimentação animal. Utilizou-se uma seringa para a realização da punção intracardíaca e obtenção do sangue total. As amostras sanguíneas foram acondicionadas em tubos com EDTA para análises hematológicas e de imunofenotipagem, e em tubos com ativador de coágulo foram colhidos o sangue para análises bioquímicas.

Dosagens bioquímicas

Cerca de 500 uL de sangue total foram acondicionados em tubo com ativador de coágulo. Após centrifugação, obteve-se o soro sanguíneo, o qual foi utilizado para análises dos marcadores hepáticos AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) e renais (Ureia e Creatinina) em Analisador bioquímico semiautomático BIO-2000 (Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda., Barueri, SP, Brasil).

Analises hematológicas

Em tubo com anticoagulante EDTA foram obtidos cerca de 250 uL de sangue total para exame de hemograma. A amostra foi analisada por hemocitômetro automático URIT BH-70P VET (URIT Medical Electronic Co. Ltd., Guilin, China). Os parâmetros avaliados incluem contagem total de eritrócitos, dosagem de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), VGM (Volume Globular Médio) (fL), HGM (Hemoglobina Globular Média) (pg), CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média) (g/dL), contagem global de leucócitos (cél/L) e diferencial (% e células/L) de leucócitos, assim como plaquetograma. As amostras foram analisadas no Laboratório de Farmacologia e Bioanálises do Centro de Biociências (UFRN).

Citometria de fluxo

Após a coleta sanguínea com EDTA de cada animal, 100 uL de sangue total foram transferidos para um tubo de hemólise de 4 mL, tratados com 1,5 mL de ACK lysing buffer Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.) para hemólise das hemácias, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Após duas lavagens com solução PBS 1X e centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, foi realizada uma incubação prévia com solução de PBA 0,5% (solução tamponada com fosfato contendo albumina) por 20 minutos para bloqueio de ligações inespecíficas. Os anticorpos, adquiridos da Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Anti-mouse CD4 (PerCP-Cyanine5.5) e Anti-mouse IFN-gama (FITC) foram diluídos em 1:80 e 1:100 (v/v), respectivamente, em solução PBA 0,5%. As amostras foram centrifugadas, e posteriormente o pellet ressuspenso em 100 uL de PBA 0,5% com aplicação dos anticorpos descritos segundo

recomendações do fabricante. A aquisição das amostras foi definida como 10000 eventos e realizadas no Setor de Citometria de Fluxo do Hemocentro Dalton Cunha (HEMONORTE/RN) no equipamento DxFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A estratégia de gate foi definida conforme Cossarizza et al. (2021) (ANEXO 1). Os dados do citômetro de fluxo foram analisados com o software FlowJo, versão 10.10.0 (BD LifeSciences, Ashland, OR, EUA). Análise estatística Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Empregou-se o teste t student com correção de Welch para variáveis contínuas com distribuição paramétrica, e para variáveis ordinais foi utilizado o teste de Mann–Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (ns > 0,05; * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001). Para os gráficos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, e para as tabelas como média ± erro padrão da média.

Resultados e Discussões

Perfil bioquímico

Como não foi possível estabelecer um grupo controle saudável para os animais fêmeas, os valores obtidos no grupo tratado foram comparados aos valores descritos na literatura para animais fêmeas saudáveis. No grupo NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX (Tabela 1), o nível sérico de ureia (48,5 ± 7,2 mg/dL) manteve-se dentro da faixa relatada para animais saudáveis (14,3–68,7 mg/dL), assim como a creatinina (0,39 ± 0,07 mg/dL), compatível com o intervalo de referência (0,22–0,66 mg/dL), e o ácido úrico (0,9 ± 0,45 mg/dL), também dentro da faixa esperada (0,5–1,5 mg/dL), indicando preservação da função renal nos animais submetidos a esse esquema terapêutico em comparação aos valores descritos para animais saudáveis. Quanto aos marcadores de função hepática (Tabela 2), a AST apresentou valor médio de 130,5 ± 82,7 UI/L, próximo ao limite superior do intervalo relatado para animais saudáveis (37–134 UI/L),. Já a ALT (68 ± 43,4 UI/L) manteve-se dentro da faixa esperada para animais saudáveis (14–140 UI/L). Em conjunto, os resultados indicam que, apesar da variabilidade individual observada, os parâmetros bioquímicos renais e hepáticos do grupo NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX permaneceram majoritariamente compatíveis com os valores fisiológicos esperados para animais saudáveis da linhagem.

Perfil hematológico

Como não foi possível estabelecer um grupo controle saudável, os valores obtidos no grupo tratado foram comparados aos valores descritos na literatura para animais saudáveis (fazer a tabela) No grupo NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX, os parâmetros do eritrograma (Tabela 1) mantiveram-se compatíveis com os valores esperados para animais saudáveis, segundo Silva-Santana et al. (2020): os eritrócitos (8,38 ± 0,86 × 10^3/µL), a hemoglobina (13,54 ± 1,252 g/dL) e o hematócrito (40,7 ± 3,96%) permaneceram dentro dos respectivos intervalos de referência (7,20–11,20 × 10^3/µL; 10,3–17,3 g/dL; e 32,2–52,5%), indicando ausência de alterações relevantes na série vermelha. Já

o leucograma (Tabela 1) revelou um cenário distinto, com valores consistentemente acima dos intervalos de referência para animais saudáveis, segundo os mesmos autores. A contagem total de leucócitos (76,67 ± 29,93 × 10^3/µL) mostrou-se substancialmente elevada em relação à referência (1,00–5,50 × 10^3/µL), padrão acompanhado pelos neutrófilos segmentados (52,83 ± 22,57 × 10^3/µL) e bastonetes (7,84 ± 5,04%), ambos muito superiores às faixas esperadas (0,02–1,38 × 10^3/µL e 0,00–0,26%, respectivamente). Os linfócitos (6,704 ± 2,065 × 10^3/µL) apresentaram-se discretamente acima do valor de referência (0,76–5,17 × 10^3/µL), enquanto os monócitos (2,628 ± 2,521 × 10^3/µL) foram os que mais se distanciaram do intervalo esperado (0,00–0,06 × 10^3/µL). Eosinófilos e basófilos não foram detectados, em conformidade com os valores de referência (0,00–0,03% e 0,00–0,00%, respectivamente).

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Na análise dos dot plots (Figura 1), foi observado um aumento expressivo da população duplo positiva CD4+/IFN-y;+ nos animais tratados com NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX, em comparação aos animais saudáveis. Em relação à produção de IFN-y; o grupo tratado com NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX apresentou frequência de células IFN-y+ semelhante à observada nos animais saudáveis, sem diferença estatística significativa entre os grupos. A imunofenotipagem de sangue periférico demonstrou que a frequência de células CD4+ e IFN-y; (Figura 2) não diferiu significativamente entre os animais saudáveis e o grupo tratado.

Discussão

Os resultados do presente estudo, em conjunto, sugerem que o esquema terapêutico NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX foi capaz de induzir uma resposta imunológica, sem comprometer de forma relevante a função renal e hepática dos animais tratados. A preservação dos parâmetros renais (ureia, creatinina e ácido úrico) quando em comparação com as faixas relatadas para animais saudáveis [12] é um achado relevante do ponto de vista de segurança, uma vez que a nefrotoxicidade é uma limitação frequentemente associada à administração de quimioterápicos como a doxorrubicina em sua forma livre. Nesse contexto, o uso de sistemas de nanoencapsulação, como o NP4T1DOX [14], pode ser uma estratégia importante, pois permite que o fármaco seja transportado de forma mais direcionada, com o objetivo de diminuir sua exposição aos tecidos saudáveis e, consequentemente, reduzir possíveis efeitos tóxicos em órgãos não alvo. Quanto à função hepática, o valor de AST próximo ao limite superior da faixa de referência [13], contrastando com uma ALT dentro dos parâmetros esperados, sugere um discreto estresse hepático, ainda sem caracterizar dano hepatocelular estabelecido. Essa dissociação entre AST e ALT é compatível tanto com a atividade citotóxica residual da doxorrubicina nanoencapsulada quanto com a resposta inflamatória transitória induzida pelo Poly(I:C) como agonista de TLR3 [15], sem necessariamente indicar hepatotoxicidade clinicamente relevante. Em contrapartida, o perfil hematológico revelou um padrão mais expressivo de alteração, especialmente no leucograma. A leucocitose acentuada, acompanhada de neutrofilia (segmentada e em bastão) e monocitose, em relação aos valores de animais saudáveis [16], é um achado

consistente com um estado inflamatório sistêmico ativo. Esse padrão pode refletir tanto a própria progressão tumoral, processo já associado a alterações hematológicas neoplásicas em modelos murinos de câncer, quanto o efeito imunoestimulador direto do Poly(I:C), conhecido por induzir maturação de células dendríticas e recrutamento de células mieloides como parte da resposta inata desencadeada pela sinalização via TLR3 [16,17,18]. Esse cenário hematológico dialoga diretamente com os achados da imunofenotipagem por citometria de fluxo. A ausência de diferença significativa na frequência total de células CD4+ entre os grupos, associada ao aumento expressivo da população duplo positiva CD4+/IFN-y+, sugere que o tratamento não promoveu necessariamente uma expansão quantitativa da população de linfócitos T CD4+, mas sim uma mudança qualitativa em seu perfil funcional, favorecendo a diferenciação e ativação de um subconjunto de células CD4+ produtoras de IFN-y. Esse achado é consistente com o mecanismo esperado do Poly(I:C) como adjuvante, que favorece a polarização Th1 por meio da ativação de células dendríticas convencionais do tipo 1 (cDC1s) [19,20]. É interessante notar que a frequência de células IFN-y+ totais não diferiu dos animais saudáveis, o que pode indicar que o aumento da população duplo positiva não se traduziu em elevação global da produção dessa citocina, possivelmente por uma redistribuição da fonte celular de IFN-y em favor dos linfócitos CD4+ especificamente, em detrimento de outras populações produtoras (como células NK ou linfócitos CD8+) [21,22], hipótese que merece investigação futura por meio de painéis de imunofenotipagem mais amplo. Esse achado é consistente com o mecanismo esperado do Poly(I:C) como adjuvante, que favorece a polarização Th1 por meio da ativação de células dendríticas convencionais do tipo 1 (cDC1s) [19,20]. É interessante notar que a frequência de células IFN-y+ totais não diferiu dos animais saudáveis, o que pode indicar que o aumento da população duplo positiva não se traduziu em elevação global da produção dessa citocina, possivelmente por uma redistribuição da fonte celular de IFN-y em favor dos linfócitos CD4+ especificamente, em detrimento de outras populações produtoras (como células NK ou linfócitos CD8+) [21,22], hipótese que merece investigação futura por meio de painéis de imunofenotipagem mais amplos. No todo, os achados sugerem que a associação entre a vacina de nanopartículas adjuvada com Poly(I:C) e o quimioterápico nanoencapsulado NP4T1DOX [11,12,13] foi capaz de induzir um microambiente sistêmico compatível com ativação imune direcionada, evidenciado pela expansão da população CD4+/IFN-y+ e pelo perfil inflamatório do leucograma,, mantendo, ao mesmo tempo, um perfil de segurança renal e hepático adequado [23,24]. Como limitação, destaca-se que a ausência de um grupo controle saudável fêmeas pareado obrigou a comparação com valores de referência descritos na literatura para padrões bioquímicos e hematológicos [12,13], obtidos em condições experimentais distintas (biotério, metodologia analítica e, possivelmente, sexo dos animais), o que pode introduzir variabilidade adicional na interpretação dos resultados. Estudos futuros incluindo um grupo controle saudável específico, bem como a caracterização de populações imunes adicionais e de marcadores de dano tecidual mais sensíveis, são recomendados para consolidar essas evidências.

Conclusão

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que o esquema terapêutico NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX foi capaz de induzir uma resposta imune direcionada, evidenciada pelo aumento expressivo da população duplo positiva CD4+/IFN-y+, sem que houvesse expansão quantitativa da população total de CD4+ ou elevação global da frequência de IFN-y+ em relação aos animais saudáveis. Esse padrão reforça a hipótese de uma reorientação qualitativa e funcional dos linfócitos T CD4+, compatível com o mecanismo adjuvante do Poly(I:C) na polarização Th1. Paralelamente, o esquema terapêutico não comprometeu de forma relevante a função renal e hepática, conforme evidenciado pela preservação da maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados, ainda que o perfil hematológico tenha revelado leucocitose acentuada, com neutrofilia e monocitose, sugestiva de um estado inflamatório sistêmico ativo. Diante desses achados, conclui-se que a associação entre a vacina de nanopartículas de goma de caju adjuvada com Poly(I:C) e o quimioterápico nanoencapsulado NP4T1DOX constitui uma estratégia promissora para indução de ativação imune antitumoral, com perfil de segurança adequado, além de estabelecer um protocolo reprodutível de imunofenotipagem por citometria de fluxo para futuros estudos em modelos murinos de câncer de mama. Recomenda-se, no entanto, que investigações futuras incluam grupos controle saudáveis pareados por sexo e linhagem, além de painéis de imunofenotipagem mais amplos, para consolidar essas evidências.

Referências

[1] BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834.
[2] ROSSI, C. et al. Breast cancer in the era of integrating “Omics” approaches. Oncogenesis, v. 11, 2022. DOI: 10.1038/s41389-022-00393-8.
[3] BERNAL-ESTEVAN, Z. et al. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models: systemic alterations. International Journal of Cancer, v. 143, n. 5, p. 1120–1129, 2018.
[4] LEI, X. et al. $CD4^+$ T cells produce IFN-I to license cDC1s for induction of cytotoxic T-cell activity in human tumors. Cellular & Molecular Immunology, v. 21, n. 4, p. 374–392, 2024.
[5] BASU, A. et al. Diferenciação e regulação de células TH: um ato de equilíbrio para a imunoterapia do câncer. Frontiers in Immunology, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.669474.
[6] ZHUANG, X. F. et al. Interferon-gamma inhibits aldehyde dehydrogenase-bright cancer stem cells in the 4T1 mouse model of breast cancer. Chinese Medical Journal, v. 135, n. 2, p. 194–204, 2021.
[7] TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, N. et al. The prognostic significance of serum interferon-gamma (IFN-γ) in hormonally dependent breast cancer. Cytokine, v. 152, p. 155836, 2022. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155836.
[8] RADULSKI, D. R.; STIPP, M. C.; GALINDO, C. M.; ACCO, A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. Translational Breast Cancer Research, v. 4, p. 1–12, 2023.

[9] SANTOS, E. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 53, n. 2, p. 138–145, 2016. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145.
[10] TORMO, N. et al. Performance comparison of a flow cytometry immunoassay for intracellular cytokine staining and the QuantiFERON® SARS-CoV-2 test for detection and quantification of SARS-CoV-2-Spike-reactive-IFN-γ-producing T cells after COVID-19 vaccination. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 41, p. 657–662, 2022. DOI: 10.1007/s10096-022-04422-7.
[11] LOUREIRO, K. et al. Cashew Gum (Anacardium occidentale) as a potential source for the production of tocopherol-loaded nanoparticles: formulation, release profile and cytotoxicity. Applied Sciences, 2021. DOI: 10.3390/app11188467.
[12] SILVA-SANTANA, G. et al. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 Mus musculus. Animal Models and Experimental Medicine, v. 3, p. 304–315, 2020. DOI: 10.1002/ame2.12139.
[13] BARBOSA, B. et al. Haematological and biochemical profile of Balb-c mice. Acta Scientiae Veterinariae, v. 45, p. 5, 2017. DOI: 10.22456/1679-9216.80473.
[14] EL-SAWY, W. S. et al. Oxyresveratrol and/or dapagliflozin attenuate doxorubicin-induced nephrotoxicity via modulation of PPAR-γ/Nrf-2/HO-1, NF-κB/TNF-α/Keap-1, and Bcl-2/Caspase-3/ATG-5 signaling pathways in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v. 398, p. 5955–5967, 2025. DOI: 10.1007/s00210-024-03608-4.
[15] RADEVA, L.; YONCHEVA, K. Doxorubicin toxicity and recent approaches to alleviating its adverse effects with focus on oxidative stress. Molecules, v. 30, 2025. DOI: 10.3390/molecules30153311.
[16] STOWELL, N. et al. Long-term activation of TLR3 by Poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. Respiratory Research, v. 10, p. 43, 2009. DOI: 10.1186/1465-9921-10-43.
[17] DUPRE, S.; HUNTER, K. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. Experimental and Molecular Pathology, v. 82, n. 1, p. 12–24, 2007. DOI: 10.1016/j.yexmp.2006.06.007.
[18] CHAI, Z. et al. MyD88 contributes to TLR3-mediated NF-κB activation and cytokine production in macrophages. Cells, v. 14, 2025. DOI: 10.3390/cells14191507.
[19] SULCZEWSKI, F. B. et al. Conventional type 1 dendritic cells induce TH1, TH1-like follicular helper T cells and regulatory T cells after antigen boost via DEC205 receptor. European Journal of Immunology, v. 50, 2020. DOI: 10.1002/eji.202048694.
[20] BULUN, H. et al. Interferon-gamma producing CD4+ T cells quantified by flow cytometry as early markers for Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in cattle. Veterinary Research, v. 55, 2024. DOI: 10.1186/s13567-024-01324-8.
[21] FINNEY, G. et al. Triphasic production of IFNγ by innate and adaptive lymphocytes following influenza A virus infection. Discovery Immunology, v. 2, 2023. DOI: 10.1093/discim/kyad014.

[22] NGOI, S.; TOVEY, M.; VELLA, A. Targeting Poly I:C to the TLR3-independent pathway boosts effector CD8 T cell differentiation through IFNα/β. The Journal of Immunology, v. 181, n. 11, p. 7670–7680, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.181.11.7670.
[23] MASTRIA, E. et al. Nanoparticle formulation improves doxorubicin efficacy by enhancing host antitumor immunity. Journal of Controlled Release, v. 269, p. 364–373, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.021.
[24] LAMOOT, A. et al. Lipid nanoparticle encapsulation empowers Poly(I:C) to activate cytoplasmic RLRs and thereby increases its adjuvanticity. Small, v. 20, p. e2306892, 2024. DOI: 10.1002/smll.202306892.

Anexos



Tabela 1 - Parâmetros hematológicos do grupo tratado (NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX) em comparação com os valores de referência descritos para camundongos BALB/c saudáveis. Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP).



Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos renais e hepáticos do grupo tratado (NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX) em comparação com os valores de referência descritos para camundongos BALB/c saudáveis. Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP).



Figura 1 - Dot plots da imunofenotipagem de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-y em camundongos BALB/c. (A) Animais saudáveis e (B) grupo tratado com NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX, evidenciando aumento da população CD4+/IFN-y+ nos animais tratados.



Figura 2 - Frequência de células CD4+ e IFN-y+ no sangue periférico de camundongos BALB/c, avaliada por citometria de fluxo, nos grupos saudável macho e tratado fêmea com NPCG-TEX46-POLY(I:C) + NP4T1DOX.

CÓDIGO: SB1348

AUTOR: MARIA LUIZA QUEIROZ DE AGUIAR

COAUTOR: DIEGO FILGUEIRA ALBUQUERQUE

COAUTOR: MARCOS VINICIUS DE CARVALHO SOUSA ROSADO

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO GALVAO BARBOZA

TÍTULO: Efeitos da fotobiomodulação sobre a atividade metabólica e proliferação de células endoteliais humanas in vitro

Resumo

A fotobiomodulação (PBM) é uma estratégia não invasiva capaz de modular respostas celulares, com potencial aplicação na regeneração vascular e na engenharia de tecidos. Este estudo avaliou os efeitos da PBM, utilizando laser de diodo a 660 nm, nas densidades de energia de 1,0, 4,0 e 7,5 J/cm², sobre a atividade metabólica, a distribuição das células ao longo do ciclo celular e a expressão de Ki-67 em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) in vitro. Células nas passagens 4–5 foram submetidas a uma única irradiação e avaliadas após 24, 48 e 72 horas. Às 72 horas, todos os grupos irradiados apresentaram aumento significativo da atividade metabólica em relação ao controle, sendo observado efeito significativo com 1,0 J/cm² ($p < 0,01$) e com 4,0 e 7,5 J/cm² ($p < 0,001$). A análise do ciclo celular evidenciou alterações na distribuição das fases, com maior proporção de células em fase S após 1,0 J/cm² e aumento progressivo da população em G2/M nos grupos de 4,0 e 7,5 J/cm². Adicionalmente, a intensidade média de fluorescência de Ki-67 aumentou de maneira dose-dependente, atingindo o maior valor com 7,5 J/cm² ($p < 0,05$). Em conjunto, os resultados demonstram que a PBM a 660 nm modula a atividade metabólica e a dinâmica do ciclo celular em HUVECs, com aumento da expressão de Ki-67, indicando efeito favorável sobre a atividade proliferativa endotelial.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Células endoteliais. Ciclo celular.

TITLE: Effects of photobiomodulation on the metabolic activity and proliferation of human endothelial cells in vitro

Abstract

Photobiomodulation (PBM) is a non-invasive strategy capable of modulating cellular responses, with potential applications in vascular regeneration and tissue engineering. This study evaluated the effects of PBM, using a 660 nm diode laser, at energy densities of 1.0, 4.0, and 7.5 J/cm², on metabolic activity, cell distribution throughout the cell cycle, and Ki-67 expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in vitro. Cells at passages 4–5 were subjected to a single irradiation and evaluated after 24, 48, and 72 hours. At 72 hours, all irradiated groups showed a significant increase in metabolic activity compared with the control, with a significant effect observed at 1.0 J/cm² ($p < 0.01$) and at 4.0 and 7.5 J/cm² ($p < 0.001$). Cell cycle analysis showed changes in phase distribution, with a higher proportion of cells in the S phase after 1.0 J/cm² and a progressive increase in the G2/M population in the 4.0 and 7.5 J/cm² groups. Additionally, the mean fluorescence intensity of Ki-67 increased in a dose-dependent manner, reaching the highest value with 7.5 J/cm² ($p < 0.05$). Taken together, the results demonstrate that 660 nm PBM modulates metabolic activity and cell cycle dynamics in HUVECs, with increased Ki-67 expression, indicating a favorable effect on endothelial proliferative activity.

Keywords: Photobiomodulation. Endothelial cells. Cell cycle.

Introdução

A terapia de luz, um tipo de PBM, consiste na aplicação de luz de baixa intensidade capaz de induzir respostas biológicas por meio da interação dos fótons com componentes celulares (Chung et al., 2011). Seus efeitos são influenciados por parâmetros como comprimento de onda, potência, tempo de exposição e densidade de energia, que determinam a interação da luz com cromóforos celulares e, consequentemente, a magnitude da resposta biológica (De Freitas; Hamblin, 2016; Karu, 2010). Entre os alvos propostos, destacam-se componentes da cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que os fótons na faixa vermelha (620–700 nm) são absorvidos por fotorreceptores endógenos, principalmente a citocromo c oxidase (complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial), desempenhando papel relevante na transdução do estímulo luminoso em alterações metabólicas e de sinalização celular (Maghfour et al., 2024). Além disso, a PBM pode favorecer a atividade proliferativa de diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais de veia umbilical, apresentando potencial de aplicação na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa (AlGhamdi; Kumar; Moussa, 2011).

A vascularização constitui um dos principais desafios da engenharia tecidual, especialmente na construção de estruturas de maior dimensão, cuja viabilidade depende do adequado fornecimento de oxigênio e nutrientes (Margolis et al., 2023). Nesse contexto, a proliferação das células endoteliais é fundamental para a reendotelização de superfícies vasculares e para a formação e o remodelamento de novos vasos, o que poderia ser beneficiado pela PBM (Soletti et al., 2010; Rosellini et al., 2022).

A proliferação depende da progressão coordenada das células ao longo do ciclo celular, que compreende as fases G0/G1, S e G2/M, relacionadas, respectivamente, ao crescimento celular, à síntese de DNA e à divisão mitótica (Ren et al., 2020). Assim, a análise da distribuição das células entre essas fases permite caracterizar alterações no estado proliferativo. Nesse contexto, o Ki-67 constitui um marcador de proliferação

celular, cuja expressão está associada às fases ativas do ciclo celular, complementando a avaliação realizada acerca da atividade proliferativa.

Entre os parâmetros da PBM, os comprimentos de onda na região do vermelho, particularmente em torno de 660 nm, têm sido associados à modulação da atividade mitocondrial, do metabolismo energético e de vias relacionadas à proliferação e à sobrevivência celular (Rohringer et al., 2017; Terena et al., 2020). Paralelamente, a resposta à PBM é influenciada pela densidade de energia, de modo que diferentes doses podem produzir respostas celulares distintas (De Freitas; Hamblin, 2016; Amaroli et al., 2018). Diante disso, o presente estudo investigou de forma integrada a atividade metabólica, a distribuição do ciclo celular e a expressão de Ki-67 em HUVECs submetidas a diferentes densidades de energia da fotobiomodulação, a fim de caracterizar de maneira mais abrangente os efeitos da técnica sobre a atividade celular endotelial.

Metodologia

Foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC-C; ATCC® CRL-1730™), mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco, EUA). As células foram cultivadas em incubadora umidificada a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2. Os experimentos foram conduzidos utilizando células entre as passagens 4 e 5 (P4–P5).

Após 24 horas de pré-cultivo para adesão celular, as HUVECs foram distribuídas em um grupo controle e três experimentais: controle (C), 1,0 J/cm² (L1), 4,0 J/cm² (L4) e 7,5 J/cm² (L7,5), em quadruplicata (n = 4). As amostras foram dispostas na mesma placa de cultura, de modo a minimizar variações nas condições ambientais durante os procedimentos experimentais.

A fotobiomodulação foi realizada por meio de laser de diodo de AlGaInP (Kondortech, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e potência de saída de 30 mW, operando em modo contínuo. O dispositivo apresentava ponta de fibra com diâmetro de 0,12 cm e área nominal do feixe de 0,0113 cm². A potência óptica foi aferida antes de cada sessão utilizando o medidor LaserCheck Power Meter (Coherent Inc., EUA).

Foram administradas densidades de energia de 1,0, 4,0 e 7,5 J/cm², correspondentes aos tempos de exposição de 33,3, 133,3 e 250,0 segundos por ponto, respectivamente. A irradiação foi realizada uma única vez, no tempo inicial do experimento (T_0). Para o ensaio de atividade metabólica, realizado em placas de 96 poços, foi utilizado um ponto central de aplicação por poço. Para as análises de ciclo celular e Ki-67, realizadas em placas de 6 poços, foram utilizados cinco pontos equidistantes por poço, visando à distribuição espacial uniforme da irradiação. A sonda foi posicionada perpendicularmente à monocamada celular, a 0,5 cm de distância. Poços vazios foram intercalados entre as amostras para minimizar o espalhamento da luz entre os grupos.

A atividade metabólica das HUVECs foi avaliada por meio do ensaio de Alamar Blue (Invitrogen, EUA) às 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Para isso, foram semeadas 5 × 10^3 células por poço em placas de 96 poços. Em cada tempo experimental, as células foram incubadas com 10 µL do reagente Alamar Blue e 90 µL de DMEM durante 4 horas, a 37 °C. A absorbância foi posteriormente determinada em leitor de microplacas Epoch (BioTek Instruments, EUA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, sendo calculado o percentual de redução do reagente.

A distribuição das células nas fases do ciclo celular foi avaliada às 72 horas após a irradiação. As HUVECs foram cultivadas em placas de 6 poços, na concentração de 2 × 10^5 células por poço, e posteriormente coletadas por tripsinização. As células foram fixadas em etanol 70% previamente resfriado e submetidas à coloração com iodeto de propídio (PI) na presença de RNase A. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA). A distribuição celular nas fases G0/G1, S e G2/M foi determinada utilizando o software FlowJo, versão 10.

A expressão do marcador de proliferação Ki-67 foi avaliada às 72 horas após a irradiação por citometria de fluxo. Após os procedimentos de fixação e permeabilização, as HUVECs foram incubadas durante 20 minutos com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 conjugado à fluoresceína (FITC), clone 7B11 (Invitrogen, EUA). A intensidade média de fluorescência (MFI) foi determinada por citometria de fluxo no equipamento FACSCanto II (BD Biosciences, EUA), utilizando o software FlowJo, versão 10.

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk utilizando o software GraphPad Prism, versão 8. Considerando a ausência de distribuição normal, as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

Atividade metabólica

A atividade metabólica das HUVECs não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos irradiados e o controle nos tempos de 24 e 48 horas após a aplicação da PBM. Em contrapartida, às 72 horas, todos os grupos irradiados apresentaram atividade metabólica significativamente superior à do grupo controle, com os maiores incrementos observados nas doses de 4,0 e 7,5 J/cm² ($p < 0,001$) e aumento também significativo na dose de 1,0 J/cm² ($p < 0,01$).

A ausência de diferenças nos primeiros tempos de avaliação, seguida pelo aumento da atividade metabólica às 72 horas, sugere uma resposta temporalmente dependente às condições de PBM utilizadas. Esse padrão é consistente com os achados de Terena et al. (2020), que demonstraram alterações na resposta proliferativa de HUVECs a partir do segundo dia após a PBM, com efeitos influenciados pela densidade de energia, pelo comprimento de onda e pelas condições experimentais. A resposta tardia observada,

portanto, pode refletir o intervalo necessário para que alterações celulares induzidas pela irradiação se tornem detectáveis por um ensaio metabólico global. Dessa forma, os resultados observados no presente estudo reforçam a importância tanto da dose quanto do tempo de avaliação na determinação da resposta celular à PBM.

Distribuição do ciclo celular

A análise do ciclo celular às 72 horas demonstrou alterações na distribuição das HUVECs entre as fases G0/G1, S e G2/M após a PBM. O grupo tratado com 7,5 J/cm² apresentou menor proporção de células em G0/G1 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Na fase S, o grupo irradiado com 1,0 J/cm² apresentou proporção significativamente superior de células quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Na fase G2/M, observou-se aumento progressivo da proporção celular com o incremento da densidade de energia, com valores significativamente superiores nos grupos de 4,0 e 7,5 J/cm² em comparação ao controle e ao grupo de 1,0 J/cm² ($p < 0,05$).

Esse padrão sugere que as diferentes densidades de energia modificaram de maneira distinta a distribuição das células ao longo do ciclo celular. Assim, os efeitos da fotobiomodulação dependem da combinação entre comprimento de onda e parâmetros dosimétricos, podendo diferentes doses produzir respostas biológicas qualitativamente distintas (De Freitas; Hamblin, 2016; Selestin Raja et al., 2024). O aumento da população em fase S no grupo de 1,0 J/cm² é compatível com maior representação de células em processo de síntese de DNA, enquanto o aumento em G2/M nas condições de 4,0 e 7,5 J/cm² indica maior representação de células nas etapas posteriores do ciclo celular.

A análise da distribuição das fases não permite, isoladamente, determinar a velocidade de progressão celular nem afirmar que todas as células que ingressaram em determinada fase completaram a divisão. Ainda assim, esse resultado está em consonância com a literatura, uma vez que Schindl et al. (2003) demonstraram que a irradiação de células endoteliais humanas com laser de 670 nm pode estimular a proliferação celular, enquanto Winter et al. (2018) observaram efeitos pró-angiogênicos da PBM em modelos endoteliais. Esses achados dão suporte à interpretação de que a exposição à luz vermelha pode interferir em processos associados ao crescimento e à proliferação endotelial.

Expressão de Ki-67

A expressão de Ki-67, avaliada por citometria de fluxo às 72 horas, apresentou aumento progressivo da intensidade média de fluorescência (MFI) nos grupos irradiados em relação ao controle. Esse aumento foi dependente da densidade de energia, atingindo o maior valor no grupo tratado com 7,5 J/cm² ($p < 0,05$).

A associação entre PBM e aumento da atividade proliferativa endotelial também é descrita na literatura. Estudos anteriores demonstraram efeitos favoráveis da irradiação sobre a proliferação e outros processos relacionados à atividade endotelial, incluindo a angiogênese, em diferentes condições experimentais (Feng et al., 2012; Winter et al., 2018; Li et al., 2020; Joniová et al., 2024). Esses achados reforçam a interpretação de que a maior expressão de Ki-67 pode estar relacionada à modulação da atividade proliferativa pelas diferentes densidades de energia empregadas.

A elevação de Ki-67 também acompanhou o aumento da atividade metabólica observado às 72 horas. A convergência desses resultados sugere que a maior atividade metabólica detectada pelo Alamar Blue esteve associada a uma população celular com maior atividade proliferativa. Entretanto, por se tratarem de medidas distintas, os resultados devem ser interpretados de forma complementar, e não como evidência de que o aumento metabólico seja exclusivamente decorrente de proliferação celular.

Conclusão

A fotobiomodulação com laser de diodo a 660 nm modulou a atividade metabólica e a distribuição do ciclo celular de células endoteliais humanas in vitro, com aumento da atividade metabólica após 72 horas, alterações na distribuição das células entre as fases do ciclo celular e aumento da expressão do marcador Ki-67. Os três parâmetros apresentaram resultados complementares, evidenciando modulação da atividade celular e do estado proliferativo. As respostas variaram conforme a densidade de energia, com efeitos mais pronunciados na condição de 7,5 J/cm². Em conjunto, os achados fornecem evidências experimentais de que a PBM exerce efeito modulador sobre a resposta endotelial, influenciando de forma integrada diferentes processos celulares, com intensidade e padrão de resposta determinados pela densidade de energia empregada.

Referências

ALGHAMDI, Khalid M.; KUMAR, Ashok; MOUSSA, Noura A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science,** v. 27, n. 1, p. 237–249, 2011.

AMAROLI, Andrea; RAVERA, Silvia; BALDINI, Francesca; et al. Photobiomodulation with 808-nm diode laser light promotes wound healing of human endothelial cells through increased reactive oxygen species production stimulating mitochondrial oxidative phosphorylation. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 3, p. 495–504, 2018. Disponível em:https://link.springer.com/article/10.1007/s10103-018-2623-5. Acesso em: 27 ago. 2026.

CHUNG, Hoon; DAI, Tianhong; SHARMA, Sulbha K.; et al. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2011.

DE FREITAS, Lucas Freitas; HAMBLIN, Michael R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, 2016.

FENG, Jie; ZHANG, Yingjie; XING, Da. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1116–1125, 2012.

JALAL MAGHFOUR; OZOG, David M.; MINEROFF, Jessica; et al. Photobiomodulation CME Part I: Overview and Mechanism of Action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2024.

JONIOVÁ, Jaroslava; GREGOR, Aurélien; LAMBELET, Martine; et al. Optimizing Photobiomodulation Radiometric and Spectral Parameters In Vitro to Enhance Angiogenesis and Mitochondrial Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 1, p. 93, 2024. Disponível em:https://www.mdpi.com/1422-0067/26/1/93. Acesso em: 27 ago. 2026.

KARU, Tiina I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB Life**, v. 62, n. 8, p. 607–610, 2010.

LI, Yue; XU, Qihua; SHI, Menglin; et al. Low-level laser therapy induces human umbilical vascular endothelial cell proliferation, migration and tube formation through activating the PI3K/Akt signaling pathway. **Microvascular Research**, v. 129, p. 103959, 2020.

MARGOLIS, Emily A.; FRIEND, Nicole E.; ROLLE, Marsha W.; et al. Manufacturing the multiscale vascular hierarchy: progress toward solving the grand challenge of tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 41, n. 11, p. 1400–1416, 2023.

RAJA, Iruthayapandi Selestin; KIM, Chuntae; OH, Nuri; et al. Tailoring photobiomodulation to enhance tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 309, p. 122623, 2024. Disponível em:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961224001571. Acesso em: 27 ago. 2026.

REN, Xiaochen; ZHAO, Moyuan; LASH, Blake; et al. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2020. Disponível em:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6985039/. Acesso em: 27 ago. 2026.

ROHRINGER, Sabrina; HOLNTHONER, Wolfgang; CHAUDARY, Sidrah; et al. The impact of wavelengths of LED light-therapy on endothelial cells. **Scientific Report**s, v. 7, n. 1, p. 10700, 2017. Disponível em:https://www.nature.com/articles/s41598-017-11061-y. Acesso em: 27 ago. 2026.

ROSELLINI, Elisabetta; BARBANI, Niccoletta; LAZZERI, Luigi; et al. Biomimetic and Bioactive Small Diameter Tubular Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. **Biomimetics**, v. 7, n. 4, p. 199, 2022.

SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L.; et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 2, p. 334–336, 2003.

SOLETTI, Lorenzo; HONG, Yi; GUAN, Jianjun; et al. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 110–122, 2010.

TERENA, Stella Maris Lins; MESQUITA-FERRARI, Raquel Agnelli; DE SIQUEIRA ARAÚJO, Andreia Martinelli; et al. Photobiomodulation alters the viability of HUVECs cells. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 1, p. 83–90, 2020.

WINTER, Raimund; DUNGEL, Peter; REISCHIES, Frederike Marie Josephine; et al. Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in-vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

Anexos



Imagem 1. Porcentagem de redução do Alamar Blue (média ± desvio-padrão) nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle (**p < 0,01; ***p < 0,001).



Imagem 2. Porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M após 72 horas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p < 0,05; teste de Kruskal–Wallis e de comparações múltiplas de Dunn).



Imagem 3. Intensidade média de fluorescência de Ki-67 nos grupos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p < 0,05; teste de Kruskal–Wallis e de comparações múltiplas de Dunn).



Imagem 4. Histogramas representativos de citometria de fluxo da intensidade de fluorescência de Ki-67 em HUVECs após 72 horas.

CÓDIGO: SB1349

AUTOR: JOAO VICTOR DANTAS SALES

ORIENTADOR: MARIA DE FATIMA FREIRE DE MELO XIMENES

TÍTULO: MOSQUITOS TRANSMISSORES DE ARBOVÍRUS NO CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONITORAMENTO E IDENTIFICAÇÃO: Colônias de Aedes aegypti e Aedes albopictus para Projetos de mestrado e doutorado

Resumo

As arboviroses são um grande alvo de pesquisas na ciência moderna. O surto de febre amarela, que encontrou seu auge na segunda metade do século XIX (SANJAD, 2003), engatilhou diversas pesquisas a respeito da influência de vetores animais na disseminação destas doenças. Hoje, as enfermidades causadas pelos mosquitos do gênero Aedes e outras espécies da mesma ordem são protagonistas de diversos debates sobre saúde pública, a dengue por exemplo, apresentou um auge histórico em 2024, onde superou os índices do ínicio dos anos 2000 (GURGEL-GONÇALVES; OLIVEIRA; CRODA, 2024). Logo, considerando que o estudo e monitoramento destas espécies, possibilita uma melhor compreensão de seus principais aspectos como ciclo de vida e características ecológicas e comportamentais, o presente trabalho teve como objetivo analisar os dados obtidos por meio desta observação. Neste viés, armadilhas com água chamadas de 'ovitrampas' foram distribuídas pelo Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em Natal, visando monitorar os índices de infestação através da oviposição de ovos nas palhetas anexas às armadilhas. Em conjunto ao uso destas, foi adicionada uma solução feita através da infusão de feno, a 10%. Os dados obtidos revelaram a forte influência de fatores climáticos na proliferação e desenvolvimento dos animais citados, denotando uma maior quantidade de oviposição em meses quentes ou de muita chuva. Por fim, é perceptível que o estudo destes seres segue essencial.

Palavras-chave: Aedes aegypti. Ovitrampas. Monitoramento entomológico. Insetário.

TITLE: ARBOVIRUS-TRANSMITTING MOSQUITOES AT THE UNIVERSITY CAMPUS - MONITORING AND IDENTIFICATION: Aedes aegypti and Aedes albopictus colonies for Master's and Doctoral projects.

Abstract

Arboviruses are a major focus of research in modern science. The yellow fever outbreak, which peaked in the second half of the 19th century (SANJAD, 2003), triggered numerous studies regarding the influence of animal vectors on the spread of these diseases. Today, illnesses caused by mosquitoes of the genus Aedes and other species of the same order are central to several public health debates; dengue, for instance, reached a historic peak in 2024, surpassing the rates recorded in the early 2000s (GURGEL-GONÇALVES; OLIVEIRA; CRODA, 2024). Therefore, considering that studying and monitoring these species enables a better understanding of their main aspects—such as life cycle and ecological and behavioral characteristics—this study aimed to analyze the data obtained through such observations. In this approach, water traps known as "ovitraps" were distributed across the Central Campus of the Federal University of Rio Grande do Norte, in Natal, to monitor infestation rates via egg deposition on the wooden paddles attached to the traps. In addition to these traps, a 10% hay infusion solution was used. The obtained data revealed the strong influence of climatic factors on the proliferation and development of the aforementioned mosquitoes, showing higher oviposition rates during warm months or periods of heavy rainfall. Ultimately, it is clear that studying these organisms remains essential.

Keywords: Aedes aegypti. Ovitraps. Entomological monitoring. Insectary.

Introdução

As arboviroses foram e seguem sendo um grave problema sanitário no Brasil e no mundo. Dentro da história recente, o pico de febre amarela registrado durante o século XIX mostrou que o estudo e monitoramento de mosquitos vetores é essencial para a manutenção da saúde pública (SANJAD, 2003). Diante disso, o cenário atual mantém-se urgente: apenas no Brasil, houve um salto de 2 milhões de casos prováveis de dengue no início dos anos 2000 para aproximadamente 11 milhões entre 2020 e 2024 (GURGEL-GONÇALVES; OLIVEIRA; CRODA, 2024). Tendo em vista que o clima tropical favorece a reprodução, o desenvolvimento e a proliferação de Aedes aegypti e Aedes albopictus (OMS, 1986), o fato de Natal abrigar grandes reservas de Mata Atlântica torna a região extremamente sensível a picos de transmissão de dengue, zika, chikungunya e febre amarela.

Logo, visando as questões supracitadas, o Laboratório de Entomologia (LABENT) realiza desde 2002 o monitoramento destes insetos de interesse médico. Pois, através do estudo de índices populacionais locais e identificação destes indivíduos, torna-se possível a compreensão de sua bioecologia, conhecimento essencial para uma possível redução no índice de infestação. Portanto o presente trabalho tem como objetivo relatar o monitoramento realizado no período 2025-2026 de dípteros vetores como Aedes aegypti e Aedes albopictus, além de espécies de famílias como Ceratopogonidae e Psychodidae dentro do espaço da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) visto sua proximidade com o Parque das Dunas.

Metodologia

Para que o monitoramento dos índices de infestação seja realizado, o modelo de armadilha escolhido foi o de ovitrampas, que consistem em recipientes plásticos (com capacidade de até 500 ml), preenchidos com água e com clipes prendendo palhetas compostas de Eucatex à parede do recipiente. À água das armadilhas foi adicionada uma solução obtida através de infusão de feno a 10%, devido ao seu potencial atrativo para as fêmeas das espécies esperadas. As ovitrampas foram monitoradas com periodicidade semanal, sendo colocadas nas seguintes frentes da universidade:

Centro de Biociências (CB/UFRN).

Centro de Tecnologia (CT/UFRN).

Departamento de Artes (DEART/UFRN).

Estação de Tratamento de Esgotos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (ETE/UFRN).

Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes (CCHLA/UFRN).

Setor de Aulas Teóricas III (Setor 3/UFRN).

Núcleo de Primatologia (Primatologia/UFRN).

A quantidade de armadilhas por local de amostra levará em conta a sua área. Assim, fatores ambientais e climáticos são registrados para melhor análise das condições. Parâmetros como índice de dispersão e densidade foram analisados segundo Magurran (1988).

(FIGURA 1, OVITRAMPA)

Ao encerrar da semana útil, as palhetas foram recolhidas para que pudessem ser examinadas em estereomicroscópio, onde ocorre também a contagem dos ovos presentes em cada uma. Ao fim do procedimento, uma porção é separada e mantida, para que após a sua eclosão os indivíduos possam ser identificados de acordo com as chaves descritas por Forattini (2002), proporcionando um panorama dos índices de infestação e quais espécies predominam em cada um destes micropolos monitorados.

(FIGURA 2, PALHETAS)

(FIGURA 3, PUPAS)

Resultados e Discussões

Tratando dos resultados obtidos após o período de um ano de monitoramento, a contagem dos ovos presentes nas ovitrampas revela os locais com maior incidência dentro do Campus Central, bem como os períodos sazonais onde os índices de infestação foram maiores. Deste modo, durante o projeto, foram contabilizados aproximadamente 16.800 ovos no somando todas as armadilhas. Ao destrinchar esse quantitativo, destacam-se o Núcleo de Primatologia e o Centro de Biociências, concentrando cerca de 66% e 32% do total coletado, respectivamente. É possível supor dois fatores que cooperaram para essa discrepância em relação aos demais pontos amostrais: o primeiro seria a característica ecológica dos ambientes, sendo ambos muito arborizados, o que propicia a formação de fitotelmos que servem como criadouros naturais para a postura de ovos e o desenvolvimento larval (ALMEIDA, 2025). Quanto à segunda razão, supõe-se que o fluxo contínuo de estudantes e a presença constante de hospedeiros (humanos e primatas não-humanos) exercem forte atratividade para as fêmeas de mosquitos (TCHOUASSI ET AL., 2019).

Analisando os maiores índices de infestação, a quarta semana de janeiro teve o maior pico de todo o período observado, com 1.734 ovos no total. Novamente, a Primatologia e o CB se destacaram, mas a ETE também teve uma grande ocorrência. O segundo maior índice foi na primeira semana de julho (1.389 ovos), seguida pela primeira semana de dezembro (1.370 ovos). É provável que esses valores tenham uma forte base climática: o calor é um fator que acelera o desenvolvimento das larvas, enquanto os períodos de alta pluviosidade (como julho) ajudam na formação de criadouros naturais que favorecem a reprodução dos mosquitos (SILVA; PRAZERES; SOUZA, 2025).

Conclusão

Por fim, as ações de monitoramento se mostraram fundamentais para o controle contínuo de dípteros vetores na região urbana de Natal. Como mencionado, o clima tropical e a existência de grandes reservas de Mata Atlântica tornam a cidade propícia para o ciclo de vida dessas espécies e a transmissão de arboviroses. Portanto, o trabalho exercido pelo Laboratório de Entomologia (LABENT), bem como o realizado durante esta iniciação científica, mostra-se essencial; os dados obtidos reforçam a grande incidência de mosquitos do gênero Aedes, além de outros culicídeos e famílias de interesse médico no campus, assim, levando este quadro a um panorama maior, é perceptível que esta ainda é um problema de impacto na saúde pública potiguar.

Referências

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

MAGURRAN, A. E. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue hemorrágica: diagnóstico, tratamento e controle. Genebra, 1986.

SANJAD, N.. Da 'abominável profissão de vampiros': Emílio Goeldi e Os mosquitos no Pará (1905). História, Ciências, Saúde-Manguinhos, v. 10, n. 1, p. 85–111, jan. 2003.

GURGEL-GONÇALVES, R.; OLIVEIRA, W. K.; CRODA, J. The greatest Dengue epidemic in Brazil: Surveillance, Prevention, and Control. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 57, e002032024, 2024. Disponível em: doi.org. Acesso em: 28 ago. 2026.

ALMEIDA, Nathália Menezes de. Fauna de mosquitos (diptera: culicidae) em ambientes fitotélmicos da reserva ecológica de Guapiaçu, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil. 2025. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

TCHOUASSI, D. P. et al. Aedes vector-host olfactory interactions in sylvatic and domestic dengue transmission environments. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 286, n. 1914, p. 20192136, 2019. Disponível em: doi.org. Acesso em: 29 ago. 2026.

SILVA, H. S. A. M. M.; PRAZERES, J. A. S.; SOUZA, A. F. Relação entre fatores climáticos e a proliferação do Aedes aegypti no Brasil. RIU - Revistas Integradas Unifatea, v. 1, n. 2, 2025. Disponível em: https://seer.unifatea.edu.br/index.php/riu/pt_BR/article/view/773. Acesso em: 29 ago. 2026.

Anexos



pupa



palheta

CÓDIGO: SB1366

AUTOR: KEREN RUAMA OLIVEIRA MARINHO

ORIENTADOR: FERNANDO VAGNER LOBO LADD

TÍTULO: Variações na angioarquitetura tridimensional do tronco braquiocefálico em saguis Callithrix jacchus

Resumo

O sistema cardiovascular apresenta elevada complexidade anatômica e funcional, sendo o arco aórtico uma estrutura fundamental para a distribuição do fluxo sanguíneo para a cabeça, membros superiores e região torácica. Apesar da utilização de Callithrix jacchus como modelo experimental em pesquisas biomédicas, ainda são limitadas as descrições morfológicas e morfométricas detalhadas do arco aórtico nessa espécie. O presente estudo teve como objetivo descrever macroscopicamente e analisar morfometricamente o arco aórtico e suas principais ramificações em C. jacchus. Foram utilizados indivíduos provenientes do Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, submetidos à dissecação, seguida de registro fotográfico, análise morfométrica e estimativa estereológica dos componentes do tronco braquiocefálico. Foram identificados três padrões anatômicos do arco aórtico (tipos A, B e C), definidos pela origem de suas ramificações. A análise estereológica evidenciou variações no volume estimado do tronco braquiocefálico entre os padrões anatômicos. Em conjunto, os resultados demonstram variações morfológicas e quantitativas do arco aórtico e do tronco braquiocefálico entre os diferentes padrões anatômicos e entre os sexos, contribuindo para a caracterização da anatomia cardiovascular de C. jacchus e fornecendo subsídios para estudos comparativos e experimentais em primatas neotropicais.

Palavras-chave: Arco aórtico; Anatomia comparada; Morfometria; Sistema cardiovascular.

TITLE: Variations in the three-dimensional angioarchitecture of the brachiocephalic trunk in Callithrix jacchus marmosets.

Abstract

The cardiovascular system presents high anatomical and functional complexity, with the aortic arch being a fundamental structure for the distribution of blood flow to the head, upper limbs, and thoracic region. Despite the use of Callithrix jacchus as an experimental model in biomedical research, detailed morphological and morphometric descriptions of the aortic arch in this species remain limited. The present study aimed to macroscopically describe and morphometrically analyze the aortic arch and its main branches in C. jacchus. Individuals from the Primate Center of the Federal University of Rio Grande do Norte were used and subjected to dissection, followed by photographic documentation, morphometric analysis, and stereological estimation of the components of the brachiocephalic trunk. Three anatomical patterns of the aortic arch (types A, B, and C) were identified, defined according to the origin of its branches. Stereological analysis revealed variations in the estimated volume of the brachiocephalic trunk among the anatomical patterns. Overall, the results demonstrate morphological and quantitative variations in the aortic arch and brachiocephalic trunk among the different anatomical patterns and between sexes, contributing to the characterization of the cardiovascular anatomy of C. jacchus and providing a basis for comparative and experimental studies in neotropical primates.

Keywords: Aortic arch; Comparative anatomy; Morphometry; Cardiovascular system.

Introdução

O sagui-de-tufo-branco (Callithrix jacchus) é um primata neotropical do Novo Mundo, com distribuição natural predominantemente associada ao Nordeste brasileiro, ocorrendo em diferentes ambientes e apresentando elevada capacidade de adaptação ecológica. A espécie também apresenta relevância para pesquisas biomédicas e experimentais, sendo utilizada como modelo em estudos envolvendo diferentes aspectos da organização morfofuncional dos primatas. Suas características anatômicas, comportamentais e fisiológicas contribuem para sua aplicação em estudos comparativos e translacionais, como o sistema cardiovascular que apresenta particular relevância devido à sua organização complexa e às variações morfológicas observadas entre diferentes espécies de mamíferos. O arco aórtico constitui um segmento fundamental da circulação sistêmica, responsável pela continuidade da aorta torácica e pela origem de vasos destinados à irrigação da cabeça, pescoço, membros torácicos e estruturas torácicas. Em humanos, o padrão clássico de ramificação compreende o tronco braquiocefálico, a artéria carótida comum esquerda e a artéria subclávia esquerda; entretanto, diferentes variações na origem, no número e na disposição desses vasos têm sido descritas.

As variações anatômicas do Arco Aórtico (AA) constituem um achado frequente em estudos anatômicos e radiológicos. Investigações em populações humanas demonstram a ocorrência de diferentes padrões de ramificação, incluindo a presença de tronco comum entre determinados vasos e origens arteriais diretamente relacionadas ao arco aórtico. Estudos cadavéricos e por métodos de imagem também têm demonstrado que essas variações podem ser acompanhadas por diferenças nas relações espaciais, distâncias entre os ramos e angulação do arco aórtico.

Além das variações consideradas mais frequentes, padrões anatômicos incomuns também podem ocorrer. Descrições de arcos aórticos com número aumentado de ramos ou com origens arteriais distintas do padrão clássico demonstram a diversidade morfológica dessa estrutura. Embora algumas dessas variações possam não apresentar manifestações clínicas, seu reconhecimento é relevante para a interpretação anatômica e radiológica e para procedimentos cirúrgicos e endovasculares realizados na região torácica e cervical. Do ponto de vista comparativo, a organização do arco aórtico apresenta diferenças entre espécies, refletindo particularidades relacionadas ao desenvolvimento vascular, à organização anatômica e às demandas funcionais do sistema circulatório. Apesar da existência de descrições detalhadas do arco aórtico em humanos e em diferentes modelos animais, o conhecimento sobre a anatomia dos grandes vasos em primatas neotropicais ainda é limitado. Essa lacuna é particularmente relevante para C. jacchus, espécie amplamente utilizada em pesquisas experimentais, para a qual a descrição sistematizada dos padrões anatômicos do arco aórtico e de suas ramificações permanece pouco explorada.

Nesse contexto, a caracterização macroscópica e morfométrica do arco aórtico em C. jacchus pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre a anatomia cardiovascular dessa espécie. A identificação de diferentes padrões de ramificação, associada à avaliação das dimensões dos principais vasos e à análise dos componentes estruturais do tronco braquiocefálico, permite uma caracterização mais abrangente da organização vascular. Além disso, a análise comparativa entre os sexos pode contribuir para identificar possíveis variações morfométricas relacionadas ao padrão anatômico do arco aórtico.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo descrever macroscopicamente os padrões anatômicos do arco aórtico em Callithrix jacchus, caracterizar morfometricamente suas principais ramificações e analisar, por estimativa estereológica, os componentes estruturais do tronco braquiocefálico, considerando os diferentes padrões anatômicos e o sexo dos animais.

Metodologia

Foram utilizados 37 (trinta e seis) saguis-de-tufo-branco (Callithrix jacchus), 24 (dezenove) machos e 13 (dezessete) fêmeas. O estudo foi conduzido em conformidade com as normas éticas nacionais para pesquisa com animais. A utilização do espécime foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), sob o protocolo nº Protocolo Nº 7/2026 - ADM/CB (17.01) CERTIFICADO Nº 23077.051219/2026-26. As amostras do arco aórtico analisadas não envolveram a realização de novos procedimentos invasivos, uma vez que foram reutilizadas a partir de animais previamente empregados em outras pesquisas desenvolvidas no Núcleo de Primatologia da UFRN, instituição devidamente registrada no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sob o nº 1/24/92/0039-00.

Todas as etapas de processamento, preservação e análise morfológica dos tecidos foram realizadas no Laboratório de Neuroanatomia (LABNEURO), vinculado ao

Departamento de Morfologia (DMOR/UFRN). Dessa forma, o presente trabalho está em plena conformidade com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, assegurando o uso ético, responsável e racional dos espécimes disponíveis. Para a análise morfométrica, as imagens digitais foram avaliadas no software ImageJ (National Institutes of Health – NIH, EUA https://github.com/imagej). Ressalta-se que, por se tratarem de medidas exclusivamente angulares, a calibração espacial não interfere nos valores obtidos.

Após a obtenção dos animais, foi realizada a dissecação do bloco cardiorrespiratório de cada indivíduo para a exposição dos vasos em análise durante a pesquisa. Em seguida, as artérias emergentes do arco aórtico foram mensuradas com o auxílio do paquímetro digital. O tronco braquicefálico foi seccionado com bisturi e pesado numa balança de precisão no laboratório. Todo o material biológico coletado foi armazenado em recipiente contendo solução de formaldeído e mantido sob refrigeração. Os troncos braquiocefálicos foram devidamente preparados para a análise histológica e posteriormente estudados em lâminas, observadas com o auxílio do microscópio. A área de cada componente estrutural do tecido visto na imagem digital foi determinada utilizando o software ImageJ.

Resultados e Discussões

A análise macroscópica do sistema cardiovascular de Callithrix jacchus permitiu a identificação e caracterização do arco aórtico e de suas principais ramificações. Observou-se, nos espécimes analisados, que o arco aórtico localiza-se na região torácica, apresentando disposição curvilínea bem definida, a partir da qual emergem os principais vasos responsáveis pela irrigação encefálica e dos membros torácicos.

No presente estudo, observou-se, com a avaliação macroscópica e morfométrica, a ocorrência de três padrões de ramificação do arco aórtico em Callithrix jacchus. O padrão predominante foi o tipo C, caracterizado pela emergência de apenas duas artérias diretamente do arco aórtico: a artéria subclávia esquerda e o tronco braquiocefálico, do qual emergem as artérias carótidas comuns direita e esquerda e a artéria subclávia direita. O segundo padrão mais frequente foi o tipo B, caracterizado pela emergência de três artérias diretamente do arco aórtico: a artéria subclávia esquerda, a artéria carótida comum esquerda, com origem próxima ao tronco braquiocefálico, e o próprio tronco braquiocefálico, do qual emerge a artéria carótida comum direita e a artéria subclávia direita. Já o tipo A foi o padrão menos frequente, sendo identificado em apenas três indivíduos. Esse padrão apresenta conformação semelhante à mais observada na espécie humana (STANDRING et al., 2021; MOORE; DALLEY; AGUR, 2018), caracterizada pela presença de três vasos originando-se diretamente do arco aórtico: o tronco braquiocefálico, a artéria carótida comum esquerda e a artéria subclávia esquerda (DE GARIS, 1941; KÖNIG; LIEBICH, 2021).

A análise estereológica evidenciou variações no volume estimado do tronco braquiocefálico entre os padrões anatômicos. Nos machos, o volume médio foi de 178,431 mm³ no tipo A; 173,096 mm³ no tipo B e 243,468 mm³ no tipo C; sendo o tipo C caracterizado pelos maiores valores médios de túnica média (76,647 mm³), lúmen

(77,593 mm³) e túnica externa (89,229 mm³). Nas fêmeas, os volumes médios foram de 58,954 mm³ no tipo A; 214,479 mm³ no tipo B e 79,878 mm³ no tipo C; com o tipo B apresentando os maiores valores médios para o lúmen (70,570 mm³) e a túnica externa (97,410 mm³). Diante destes valores, é possível concluir que, nos machos, a soma total das áreas dos componentes teciduais da artéria, é maior nos indivíduos que apresentam a configuração tipo C do arco aórtico. Nas fêmeas, a maior soma das áreas dos componentes estruturais no corte transversal no tecido do tronco braquicefálico é nos indivíduos que apresentam o arco do tipo B.

Conclusão

Em estudos de anatomia comparada, variações na disposição dos ramos do arco aórtico são frequentemente relatadas entre mamíferos, estando associadas a adaptações funcionais e hemodinâmicas (BERGMAN et al., 1988; KARDONG, 2019). Nesse contexto, a presença de três ramos principais em C. jacchus sugere uma organização vascular compatível com a necessidade de irrigação encefálica eficiente, característica marcante dos primatas, particularmente em espécies com elevado desenvolvimento cortical.

Os resultados morfométricos revelam variações relevantes angioarquitetura, no comprimento e na largura das principais ramificações associadas ao arco aórtico em C. jacchus. Resultados estereológicos Observa-se que as artérias subclávias e carótidas comuns apresentam amplitudes angulares distintas, sugerindo uma organização espacial específica do arco aórtico nesta espécie. Essas variações reforçam a importância de descrições morfoquantitativas detalhadas em primatas neotropicais, contribuindo para comparações interespecíficas e para a compreensão da organização vascular em modelos experimentais.

Assim como no C. jacchus, estudos revelaram que espécimes de Callithrix penicillata também apresentam indivíduos na classificação do tipo A e C na descrição do arco aórtico (ALBUQUERQUE et al., 2006), compreendendo a proximidade filogenética das espécies na família Callithrichidae, pertencentes ao mesmo grupo. Sugerindo a necessidade de estudos em um número maior de indivíduos das duas espécies para uma avaliação precisa da frequência desses casos. Esse tipo de investigação é fundamental para a anatomia comparada, contribuindo para a compreensão da variabilidade morfológica e para a validação do uso da espécie como modelo anatômico em pesquisas biomédicas.

É relevante, uma vez que descrições anatômicas detalhadas do arco aórtico em primatas não humanos permanecem limitadas na literatura (SMITH et al., 2004), que os achados do presente estudo contribuam para preencher lacunas no conhecimento da anatomia cardiovascular comparada e reforçar a aplicabilidade de C. jacchus como modelo experimental em pesquisas biomédicas.

Referências

ALBUQUERQUE, J. F. G. de et al. Ramos colaterais do arco aórtico de Callithrix penicillata (Primate, Callitrichidae). Bioscience Journal, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 119-123, maio/ago. 2006. Disponível em:https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6710.

BERGMAN, Ronald A.; THOMPSON, Scott A.; AFIFI, Adel K.; SAADEH, Fayez A. Compendium of human anatomic variation: text, atlas, and world literature. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1988.

KARDONG, Kenneth V. Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. 8. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2019.

KÖNIG, Horst Erich; LIEBICH, Hans-Georg. Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2021. 848 p.

MOORE, Keith L.; DALLEY, Arthur F.; AGUR, Anne M. R. Anatomia orientada para a clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Wolters Kluwer, 2018.

MURRAY, A.; MEGUID, E. A. Anatomical variation in the branching pattern of the aortic arch: a literature review. Irish Journal of Medical Science (1971 -), [s. l.], v. 192, n. 4, p. 1807-1817, ago. 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/s11845-022-03196-3. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s11845-022-03196-3.

OZAKI, T.; KIKUTA, S.; YOSHIDA, M.; SATO, K.; YAMAMOTO, M. Comparative anatomy of the aortic arch in mammals. Anatomical Science International, Tokyo, v. 85, n. 3, p. 129–138, 2010.

RAO, N. S. K. K.; SUJATHA, K.; RAO, H. R. K. Aortic arch arteries in man and domestic animals: a comparative study. International Journal of Anatomy Research, v. 4, n. 4, p. 3087–3091, 2016.

SMITH, B. R.; JOHNSON, C. M.; WILLIAMS, K. D. Cardiovascular anatomy in non-human primates. Journal of Medical Primatology, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2004.

STANDRING, Susan et al. Gray's anatomy: a base anatômica da prática clínica. 42. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2021.

CÓDIGO: SB1367

AUTOR: WALDNEY SILVA MUNIZ

COAUTOR: MARCOS VINICIUS DE CARVALHO SOUSA ROSADO

COAUTOR: DIEGO FILGUEIRA ALBUQUERQUE

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO GALVAO BARBOZA

TÍTULO: EFEITO DA FOTOBIOMODULAÇÃO EM DOSE ÚNICA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS: ESTUDO IN VITRO

Resumo

A fotobiomodulação (FBM) é uma estratégia não invasiva estudada por seu potencial de estimular a proliferação celular e sua aplicação na engenharia tecidual vascular. Este estudo avaliou os efeitos de uma única aplicação de FBM com laser de 660 nm sobre células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs-C), com ênfase na viabilidade e morte celular. As células foram cultivadas em D-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, sendo distribuídas em quatro grupos: controle não irradiado (C) e irradiados com 1,0 J/cm² (L1), 4,0 J/cm² (L4) e 7,5 J/cm² (L7.5). Após 72 horas, foram avaliadas pelos ensaios Live/Dead e Anexina V/PI. No Live/Dead, observou-se predominância de células viáveis em todos os grupos, com maior número de células viáveis por campo nos irradiados, especialmente L1 e L7.5. Apesar de pequenas diferenças na porcentagem de células mortas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Na citometria de fluxo com Anexina V/PI, a porcentagem de células viáveis permaneceu elevada, variando de 95,2% no controle a 96,9% no L7.5, sem aumento evidente de apoptose precoce, tardia ou necrose. Assim, nas condições avaliadas, uma única aplicação de FBM a 660 nm não promoveu citotoxidade detectável nas HUVECs-C e preservou elevada viabilidade celular.

Palavras-chave: Cultivo celular; Células endoteliais; Fotobiomodulação.

TITLE: EFFECT OF SINGLE-DOSE PHOTOBIOMODULATION ON THE VIABILITY OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS: AN IN VITRO STUDY

Abstract

Photobiomodulation (PBM) is a non-invasive strategy studied for its potential to stimulate cell proliferation and its application in vascular tissue engineering. This study evaluated the effects of a single application of 660 nm laser PBM on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs-C), with emphasis on cell viability and cell death. Cells were cultured in D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic- antimycotic solution and distributed into four groups: non-irradiated control (C) and groups irradiated with 1.0 J/cm² (L1), 4.0 J/cm² (L4), and 7.5 J/cm² (L7.5). After 72 hours, cells were evaluated using Live/Dead and Annexin V/PI assays. In the Live/Dead assay, viable cells predominated in all groups, with a higher number of viable cells per field in the irradiated groups, particularly L1 and L7.5. Despite small differences in the percentage of dead cells, no statistically significant differences were observed between groups. In flow cytometry analysis using Annexin V/PI, the percentage of viable cells remained high, ranging from 95.2% in the control group to 96.9% in L7.5, with no evident increase in early apoptosis, late apoptosis, or necrosis. Thus, under the conditions evaluated, a single application of 660 nm PBM did not induce detectable cytotoxicity in HUVECs-C and preserved high cell viability.

Keywords: Cell culture; Endothelial cells; Photobiomodulation.

Introdução

A engenharia tecidual vascular depende da formação de redes vasculares funcionais capazes de assegurar o fornecimento de oxigênio e nutrientes aos tecidos (Yang et al, 2020). As células endoteliais desempenham papel central nesse processo, participando da homeostase vascular, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (Fonseca et al. 2020; Witjas et al. 2019). Nesse contexto, a obtenção de células endoteliais viáveis e funcionalmente adequadas constitui aspecto fundamental para estratégias de vascularização e endotelização (Sánchez et al. 2018). A fotobiomodulação (FBM), baseada na aplicação de luz de baixa intensidade, tem sido investigada como uma estratégia não invasiva capaz de modular diferentes respostas celulares, incluindo proliferação, migração e processos relacionados à angiogênese (Zein et al., 2018). Em células endoteliais, estudos demonstram que a FBM pode influenciar a proliferação celular e a expressão de mediadores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de favorecer processos relacionados à formação vascular (Szymanska et al., 2013; Zhang et al., 2022). Entretanto, as respostas biológicas induzidas pela FBM podem variar de acordo com os parâmetros utilizados, incluindo comprimento de onda,

irradiância, densidade de energia e tempo de exposição. Diferentes combinações desses parâmetros podem produzir respostas celulares distintas, sendo necessária a avaliação específica de cada protocolo experimental (Zein et al., 2018). Além da avaliação de possíveis efeitos estimuladores sobre as células, a análise da viabilidade e da morte celular é fundamental para determinar a segurança dos protocolos de FBM. O ensaio Live/Dead permite avaliar a viabilidade celular a partir da identificação de células com membrana plasmática íntegra e células não viáveis. Já a marcação com Anexina V/PI possibilita a caracterização de diferentes populações celulares, permitindo distinguir células viáveis, apoptóticas e necróticas (Rieger et al., 2011). O estudo de origem foi realizado com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) mantidas em condições padrão de cultivo, sem indução experimental de estresse celular (Albuquerque et al., 2026). Assim, o presente relatório mantém essa característica metodológica e concentra sua análise nos ensaios de Live/Dead e Anexina V/PI.

OBJETIVO

Avaliar os efeitos de uma única aplicação de fotobiomodulação com laser de 660 nm, nas densidades de energia de 1,0, 4,0 e 7,5 J/cm², sobre a viabilidade celular e os eventos de morte celular em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), utilizando os ensaios Live/Dead e Anexina V/PI às 72 horas após a irradiação.

Metodologia

Cultivo celular

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs-C; ATCC® CRL-1730™; ATCC, EUA) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco, EUA). As células foram mantidas em incubadora umidificada (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 37 °C e 5% de CO_2. Todos os experimentos foram realizados utilizando HUVECs nas passagens 4–5 (P4–P5).

Protocolo de irradiação

A irradiação foi realizada utilizando laser de diodo InGaAlP (Kondortech, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm, potência de saída de 30 mW, diâmetro da ponta de fibra de 0,12 cm, área nominal do feixe de 0,0113 cm^2 e emissão contínua. A potência de saída foi aferida antes de cada aplicação com um LaserCheck Power Meter (Coherent Inc., EUA). Foram utilizadas densidades de energia de 1,0, 4,0 e 7,5 J/cm^2, correspondentes a tempos de irradiação de 33,3, 133,3 e 250,0 s por ponto, respectivamente. Para os ensaios realizados em placas de seis poços, a irradiação foi aplicada em cinco pontos equidistantes, com a sonda posicionada perpendicularmente à monocamada celular, a 0,5 cm de distância. A irradiação foi realizada uma única vez, em T0, após 24 h de pré-cultivo.

Ensaio de viabilidade e morte celular

No ensaio Live/Dead, foram utilizadas placas de seis poços com densidade de 2×10^5 células/poço. Após 72 horas da irradiação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 2 µM de calceína AM e 4 µM de homodímero de etídio-1 por 20 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Imager A2. Foram obtidas quatro fotomicrografias do campo central de cada amostra, com aumento de 100×. As imagens foram analisadas no ImageJ, considerando-se o número absoluto de células viáveis e a porcentagem de células mortas. Para avaliação dos eventos de morte celular, foi utilizado o kit FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis (Invitrogen) por citometria de fluxo. As células foram semeadas na densidade de 2×10^5 células/poço em placas de seis poços e avaliadas 72 horas após a irradiação. Após lavagem com PBS e ressuspensão em tampão de ligação, as células foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz, com Anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra em citômetro FACSCanto II. A Anexina V-FITC foi utilizada para identificar células em apoptose precoce, enquanto o PI permitiu identificar células em apoptose tardia e necrose.

Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de Shapiro–Wilk. Como os dados não apresentaram distribuição normal, foram empregados testes não paramétricos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas
pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando-se nível de significância de $p<0,05$.

Resultados e Discussões

Ensaio de viabilidade celular

Após 72 h da irradiação, o ensaio Live/Dead demonstrou predominância de células viáveis em todos os grupos experimentais. A contagem por campo revelou valores significativamente maiores nos grupos irradiados em comparação ao controle, commdiferenças mais acentuadas em L1 e L7,5. Em contrapartida, a porcentagem de célulasnão viáveis permaneceu baixa e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 1). Esses resultados indicam aumento da densidade celular nas condições irradiadas sem comprometimento da viabilidade.

Figura 1. Avaliação da viabilidade das HUVECs pelo ensaio Live/Dead após 72 h. (A) Imagens representativas dos diferentes grupos experimentais, com células viáveis identificadas pela fluorescência verde da calceína AM e células não viáveis pela fluorescência vermelha do homodímero de etídio-1. Barra de escala = 200 μm. (B) Quantificação de células viáveis por campo. (C) Percentual de células mortas por campo. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. $P < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; em (C), não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Ensaio de morte celular

A análise por Anexina V/PI confirmou elevada viabilidade celular em todos os grupos após 72 h, com valores entre 95,2% no controle e 96,9% em L7,5. As populações correspondentes à apoptose precoce, apoptose tardia e necrose

permaneceram reduzidas, sem aumento evidente nos grupos submetidos à FBM (Figura 2). Em conjunto com os achados do Live/Dead, esses resultados indicam que o protocolo de irradiação utilizado não promoveu citotoxicidade detectável.

Figura 2. Gráficos de pontos de citometria de fluxo representativos da coloração de Anexina V–FITC/PI em HUVECs às 72 h. Q1, Anexina V^-/PI^+ (células necróticas); Q2, Anexina V^+/PI^+ (células apoptóticas tardias); Q3, Anexina V^+/PI^- (células apoptóticas precoces); e Q4, Anexina V^-/PI^- (células viáveis).

Em conjunto, os dois ensaios indicaram manutenção de elevada viabilidade celular após uma única aplicação de FBM com 660 nm, sem evidência de efeito citotóxico detectável nas condições experimentais avaliadas.

DISCUSSÃO

A fotobiomodulação (PBM) tem sido estudada como uma estratégia não invasiva para modular o comportamento celular, embora a definição de parâmetros ideais dependa do tipo celular e das condições de irradiação (de Freitas; Hamblin, 2016; da Silva et al., 2023). Na engenharia de tecidos vasculares, sua aplicação é particularmente relevante devido ao papel das células endoteliais na vascularização e endotelização (Devillard; Marquette, 2021; Margolis et al., 2023). No presente estudo, a PBM de 660 nm, aplicada em diferentes densidades de energia, preservou elevada viabilidade das HUVECs e não apresentou evidências de citotoxicidade. As HUVECs foram mantidas em condições padrão de cultura, sendo um modelo amplamente utilizado para estudos de vascularização (Margolis et al., 2023).

A literatura demonstra que as respostas à PBM dependem do comprimento de onda, irradiância, densidade de energia e tempo de exposição (de Freitas; Hamblin, 2016; Zein et al., 2018; Joniová et al., 2025). Estudos anteriores relatam efeitos favoráveis da luz vermelha sobre células endoteliais, enquanto doses ou parâmetros inadequados podem produzir respostas menos favoráveis ou até estresse celular (Schindl et al., 2003; Góralczyk et al., 2015; Rohringer et al., 2017; Terena et al., 2021). No presente estudo, foram avaliadas doses de

1,0, 4,0 e 7,5 J/cm², com análise 72 horas após uma única aplicação. Todas as condições apresentaram elevada viabilidade celular. O ensaio Live/Dead demonstrou predominância de células viáveis em todos os grupos, sem diferenças estatisticamente significativas na quantidade de células não viáveis. Da mesma forma, a análise por Anexina V/PI revelou elevada proporção de células viáveis, sem aumento evidente de apoptose precoce, apoptose tardia ou necrose nos grupos irradiados. A concordância entre os dois ensaios reforça que a PBM de 660 nm não promoveu citotoxicidade detectável nas condições avaliadas. A manutenção da sobrevivência celular é relevante para aplicações em engenharia de tecidos, uma vez que células endoteliais viáveis são essenciais para processos de vascularização e endotelização (Wu et al., 2018; Devillard; Marquette, 2021; Rosellini et al., 2022). Estudos prévios sugerem que a PBM pode apresentar efeitos citoprotetores e modular processos relacionados ao estresse celular, embora os mecanismos moleculares responsáveis não tenham sido investigados diretamente no presente estudo (Chu et al., 2018; Feng et al., 2024). Do ponto de vista translacional, a PBM apresenta potencial como estratégia complementar à engenharia de tecidos vasculares, podendo modular o comportamento celular sem a necessidade de fatores de crescimento exógenos ou modificações complexas de biomateriais (Ren et al., 2020; Beheshtizadeh et al., 2023; Selestin Raja et al., 2024). Além da viabilidade, estudos anteriores relacionam a PBM a efeitos sobre migração, angiogênese e organização celular (Cury et al., 2013; Li et al., 2020; Winter et al., 2018; da Silva Oliveira et al., 2025). Entretanto, como o presente recorte avaliou especificamente a viabilidade e os eventos de morte celular, seus resultados não permitem inferir aumento da funcionalidade endotelial ou da capacidade de formação de vasos. Entre as limitações do estudo estão o uso de culturas bidimensionais, o período de avaliação de apenas 72 horas, a utilização de um único comprimento de onda e a aplicação de uma única irradiação. Além disso, não foram realizados ensaios funcionais de migração ou formação de redes capilares, nem investigações dos mecanismos moleculares envolvidos. Estudos futuros deverão incluir parâmetros funcionais, como migração celular, formação de redes capilares e respostas angiogênicas, bem como modelos tridimensionais, co-culturas e períodos experimentais mais prolongados. Esses estudos serão necessários para determinar se a preservação da viabilidade observada neste modelo é acompanhada por efeitos favoráveis sobre a funcionalidade endotelial.

Conclusão

Os resultados demonstram que a aplicação única de fotobiomodulação a 660 nm, nas densidades de energia de 1,0, 4,0 e 7,5 J/cm², preservou elevada

viabilidade das células endoteliais humanas (HUVECs) após 72 horas. As análises pelos ensaiosLive/Dead e Anexina V/PI não evidenciaram aumento significativo de morte celular, apoptose ou necrose nos grupos irradiados, indicando ausência de citotoxicidadedetectável nas condições experimentais avaliadas. Esses achados demonstram um perfil favorável de viabilidade celular para a PBM nas condições estudadas e sustentam seu potencial como estratégia adjuvante em abordagens de engenharia de tecidos vasculares.

Referências

ALBUQUERQUE, D. F.; SABINO, V. G.; FARIAS, N. B. S.; SANTOS, P. P. A.; MARTINS, M. D.; BRAZ, J. K. F. S.; BARBOZA, C. A. G. Photobiomodulation at 660 nm enhances proliferative activity while preserving viability in human endothelial cells in vitro. Cell and Tissue Banking, v. 27, p. 38, 2026. DOI: 10.1007/s10561-026-10237-z.

BEHESHTIZADEH, N.; GHARIBSHAHIAN, M.; BAYATI, M.; MALEKI, R.; STRACHAN, H.; DOUGHTY, S.; TAYEBI, L. Vascular endothelial growth factor (VEGF) delivery approaches in regenerative medicine. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 166, p. 115301, 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115301.

CHU, Y. H.; CHEN, S. Y.; HSIEH, Y. L.; TENG, Y. H.; CHENG, Y. J. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF-α/cycloheximide-induced apoptosis. Lasers in Medical Science, v. 33, p. 279-286, 2018. DOI: 10.1007/s10103-017-2364-x.

CURY, V.; MORETTI, A. I.; ASSIS, L.; BOSSINI, P.; CRUSCA, J. S.; NETO, C. B.; FANGEL, R.; DE SOUZA, H. P.; HAMBLIN, M. R.; PARIZOTTO, N. A. Low

level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1α and MMP-2. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 125, p. 164-170, 2013. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004.

DA SILVA, T. G.; RIBEIRO, R. S.; MENCALHA, A. L.; DE SOUZA FONSECA, A. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. Lasers in Medical Science, v. 38, p. 136, 2023. DOI: 10.1007/s10103-023-03801-6.

DA SILVA OLIVEIRA, V. R.; VARSANI, R.; ZEHRA, M.; DALE, C. S.; ARANY, P. Endothelial cell responses to photobiomodulation treatments in diabetic wounds aremediated via concerted PDGF, VEGF and TGF-β signalling. Wound Repair and Regeneration, v. 33, p. e70068, 2025. DOI: 10.1111/wrr.70068.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, v. 22, p. 7000417, 2016. DOI: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.

DEVILLARD, C. D.; MARQUETTE, C. A. Vascular tissue engineering: challenges and requirements for an ideal large scale blood vessel. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 9, p. 721843, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.721843.

FENG, Y.; HUANG, Z.; MA, X.; ZONG, X.; TESIC, V.; DING, B.; WU, C. Y.; LEE, R. H.; ZHANG, Q. Photobiomodulation inhibits ischemia-induced brain endothelial senescence

via endothelial nitric oxide synthase. Antioxidants, v. 13, p. 633, 2024. DOI: 10.3390/antiox13060633.

GÓRALCZYK, K.; SZYMAŃSKA, J.; ŁUKOWICZ, M.; DRELA, E.; KOTZBACH, R.; DUBIEL, M.; MICHALSKA, M.; GÓRALCZYK, B.; ZAJĄC, A.; ROŚĆ, D. Effect of LLLT on endothelial cells culture. Lasers in Medical Science, v. 30, p. 273-278, 2015. DOI: 10.1007/s10103-014-1650-0.

JONIOVÁ, J.; GREGOR, A.; LAMBELET, M.; DÉGLISE, S.; ALLAGNAT, F.; WAGNIÈRES, G. Optimizing photobiomodulation radiometric and spectral parameters in vitro to enhance angiogenesis and mitochondrial function. International Journal of Molecular Sciences, v. 26, p. 93, 2025. DOI: 10.3390/ijms26010093.

LI, Y.; XU, Q.; SHI, M.; GAN, P.; HUANG, Q.; WANG, A.; TAN, G.; FANG, Y.; LIAO, H. Low-level laser therapy induces human umbilical vascular endothelial cell proliferation, migration and tube formation through activating the PI3K/Akt signaling pathway. Microvascular Research, v. 129, p. 103959, 2020. DOI: 10.1016/j.mvr.2019.103959.

MARGOLIS, E. A.; FRIEND, N. E.; ROLLE, M. W.; ALSBERG, E.; PUTNAM, A. J. Manufacturing the multiscale vascular hierarchy: progress toward solving the grand challenge of tissue engineering. Trends in Biotechnology, v. 41, p. 1400-1416, 2023.DOI: 10.1016/j.tibtech.2023.04.003.

REN, X.; ZHAO, M.; LASH, B.; MARTINO, M. M.; JULIER, Z. Growth factor engineering

strategies for regenerative medicine applications. Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology, v. 7, p. 469, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00469.

ROHRINGER, S.; HOLNTHONER, W.; CHAUDARY, S.; SLEZAK, P.; PRIGLINGER, E.;
STRASSL, M.; PILL, K.; MÜHLEDER, S.; REDL, H.; DUNGEL, P. The impact of
wavelengths of LED light-therapy on endothelial cells. Scientific Reports, v. 7, p. 10700,
2017. DOI: 10.1038/s41598-017-11061-y.

ROSELLINI, E.; BARBANI, N.; LAZZERI, L.; CASCONE, M. G. Biomimetic and bioactive
small diameter tubular scaffolds for vascular tissue engineering. Biomimetics, v. 7, p.
199, 2022. DOI: 10.3390/biomimetics7040199.

SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L.; KAUN, C.; WOJTA, J. Direct stimulatory
effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation.
British Journal of Dermatology, v. 148, p. 334-336, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2003.05070.x..

SELESTIN RAJA, I.; KIM, C.; OH, N.; PARK, J. H.; HONG, S. W.; KANG, M. S.; MAO,
C.; HAN, D. W. Tailoring photobiomodulation to enhance tissue regeneration.
Biomaterials, v. 309, p. 122623, 2024. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122623.

TERENA, S. M. L.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; DE SIQUEIRA ARAÚJO, A. M.;
FERNANDES, K. P. S.; FERNANDES, M. H. Photobiomodulation alters the viability of
HUVECs cells. Lasers in Medical Science, v. 36, p. 83-90, 2021. DOI:

10.1007/s10103-020-03016-z.

WINTER, R.; DUNGEL, P.; REISCHIES, F. M. J.; ROHRINGER, S.; SLEZAK, P.; SMOLLE, C.; SPENDEL, S.; KAMOLZ, L. P.; GHAFFARI-TABRIZI-WIZSY, N.; SCHICHO, K. Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in-vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model. Scientific Reports, v. 8, p. 17080, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-35474-5.

WU, J.; HU, C.; TANG, Z.; YU, Q.; LIU, X.; CHEN, H. Tissue-engineered vascular grafts: balance of the four major requirements. Colloid and Interface Science Communications, v. 23, p. 34-44, 2018. DOI: 10.1016/j.colcom.2018.01.005.

ZEIN, R.; SELTING, W.; HAMBLIN, M. R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. Journal of Biomedical Optics, v. 23, n. 12, p. 120901, 2018. DOI: 10.1117/1.JBO.23.12.120901.

Anexos



Figura 1. Avaliação da viabilidade das HUVECs pelo ensaio Live/Dead após 72 h.



Figura 2. Gráficos de pontos de citometria de fluxo representativos da coloração de Anexina V–FITC/PI em HUVECs às 72 h.

CÓDIGO: SB1370

AUTOR: ANA CLARA GALDINO JARDIM

ORIENTADOR: VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do amido da semente de Artocarpus heterophyllus sobre comportamentos associados à ansiedade, atividade locomotora e à depressão.

Resumo

O transtorno depressivo maior e os transtornos de ansiedade representam importantes problemas de saúde pública, havendo necessidade de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, produtos naturais têm sido investigados devido à diversidade de compostos bioativos e ao potencial farmacológico. A espécie *Artocarpus heterophyllus* Lam., conhecida como jaca, apresenta sementes ricas em amido e potencial farmacêutico. O presente estudo avaliou os efeitos do amido da semente de *A. heterophyllus* sobre comportamentos associados à ansiedade, atividade locomotora e depressão em ratas Wistar. Os animais foram distribuídos em grupos controle e tratados com 250 ou 500 mg/kg do amido. A ansiedade foi avaliada pelo labirinto em cruz elevado, enquanto a atividade locomotora foi investigada pelo labirinto e campo aberto. O comportamento associado à depressão foi avaliado pelo teste do nado forçado, considerando imobilidade, climbing e swimming. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros de ansiedade, distância percorrida ou velocidade média. No nado forçado, também não houve diferenças significativas nos tempos de imobilidade e climbing. Para swimming, observou-se tendência de redução nos grupos tratados, porém sem significância estatística. Dessa forma, nas condições experimentais avaliadas, o amido da semente de A. heterophyllus não promoveu alterações comportamentais significativas nos parâmetros avaliados de ansiedade, locomoção e depressão em ratas.

Palavras-chave: Artocarpus heterophyllus. Ansiedade. Depressão. Nado forçado.

TITLE: Evaluation of the effects of Artocarpus heterophyllus seed starch on anxiety-like behaviors, locomotor activity, and depression-related behaviors.

Abstract

Major depressive disorder and anxiety disorders represent important public health problems, highlighting the need for new therapeutic alternatives. In this context, natural products have been investigated due to their diversity of bioactive compounds and pharmacological potential. The species *Artocarpus* heterophyllus Lam., commonly known as jackfruit, has seeds rich in starch and pharmaceutical potential. The present study evaluated the effects of A. *heterophyllus* seed starch on behaviors associated with anxiety, locomotor activity, and depression in Wistar rats. The animals were divided into control groups and groups treated with 250 or 500 mg/kg of starch. Anxiety was assessed using the elevated plus maze, while locomotor activity was investigated using the elevated plus maze and open field test. Depression-related behavior was evaluated using the forced swim test, considering immobility, climbing, and swimming. No significant differences were observed between groups in anxiety parameters, distance traveled, or mean speed. In the forced swim test, there were also no significant differences in immobility and climbing times. For swimming, a tendency toward reduction was observed in the treated groups, but without statistical significance. Therefore, under the experimental conditions evaluated, *A. heterophyllus* seed starch did not promote significant behavioral changes in the assessed parameters of anxiety, locomotion, and depression in rats.

Keywords: Artocarpus heterophyllus. Anxiety. Depression. Forced swimming.

Introdução

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença neuropsiquiátrica crônica, recorrente e altamente prevalente, caracterizada por alterações persistentes do humor, perda de interesse ou prazer em atividades previamente consideradas recompensadoras, alterações cognitivas, distúrbios do sono e modificações no apetite (American Psychiatric Association, 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde, os transtornos depressivos representam uma importante causa de incapacidade global, afetando indivíduos de diferentes faixas etárias e apresentando maior prevalência em mulheres (OMS, 2023). O tratamento farmacológico da depressão envolve principalmente o uso de antidepressivos pertencentes às classes dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoaminoxidase e fármacos atípicos. Apesar da eficácia desses medicamentos em parte dos pacientes, muitos indivíduos apresentam resposta terapêutica insuficiente ou desenvolvem efeitos adversos que podem comprometer a adesão ao tratamento (Fanelli et al., 2022). Além disso, a depressão resistente ao tratamento representa um desafio clínico, sendo caracterizada pela ausência de resposta adequada após diferentes tentativas terapêuticas (Sackeim, 2001). Diante dessas limitações, a identificação de novos compostos com potencial farmacológico torna-se uma importante área de

investigação. Nesse contexto, produtos naturais têm recebido destaque devido à diversidade de moléculas bioativas presentes em sua composição e ao potencial para descoberta de novas alternativas terapêuticas. A espécie *Artocarpus heterophyllus* Lam., conhecida popularmente como jaca, é uma fruta tropical amplamente consumida e apresenta sementes ricas em amido, composto que possui aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Kittipongpatana; Kittipongpatana, 2015). Estudos demonstram que o amido extraído da semente da jaca apresenta propriedades funcionais relevantes e pode atuar como fonte sustentável para diferentes aplicações. Além disso, investigações preliminares sugerem possíveis efeitos farmacológicos desse composto, incluindo atividade hipoglicemiante (Ajiboye et al., 2020) e efeitos relacionados à sedação em modelos animais (Ratnasooriya; Jayakody, 2002). Entretanto, ainda são limitadas as informações sobre os efeitos do amido da semente da jaca sobre comportamentos relacionados à ansiedade, à atividade locomotora e à depressão. A utilização de diferentes modelos comportamentais permite avaliar esses parâmetros de maneira complementar, contribuindo para a caracterização do perfil farmacológico do composto. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo inicial avaliar os efeitos do amido da semente de *A. heterophyllus* através do desamparo aprendido, porém como não obtivemos a validação adequada neste modelo, optamos por realizar os testes do labirinto em cruz elevado, do campo aberto e do teste do nado forçado que se relacionam com comportamentos associados à ansiedade, atividade locomotora e depressão, respectivamente.

Metodologia

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do Departamento de Biofísica e Farmacologia da UFRN, mantidas em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração padrão. Foram avaliados três grupos experimentais, constituídos por animais controle e animais tratados com 250 ou 500 mg/kg do amido da semente de *Artocarpus heterophyllus*, com sete animais por grupo. A extração do amido das sementes de *A. heterophyllus* foi realizada conforme metodologia descrita por Lawal e Adebowale (2005), com adaptações. O amido obtido foi utilizado no tratamento dos animais. A administração foi realizada por via oral, enquanto os animais do grupo controle receberam, em volume equivalente, a mesma solução utilizada para dissolver o amido.

Para avaliação dos efeitos comportamentais foram utilizados o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), o Campo Aberto e o teste do Nado Forçado.

No Labirinto em Cruz Elevado, os animais foram avaliados quanto ao número de entradas e ao tempo de permanência nos braços abertos, utilizados como parâmetros relacionados ao comportamento do tipo ansioso, e ao número de entradas nos braços fechados, utilizado como indicador de atividade locomotora.

O aparato consiste em quatro braços dispostos em formato de cruz, sendo dois abertos e dois fechados, elevados em relação ao solo. A avaliação comportamental foi realizada durante período determinado pelo protocolo experimental, sendo os parâmetros registrados para posterior análise. O modelo do LCE é amplamente utilizado para investigação de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (Pellow et al., 1985).

No Campo Aberto, os animais foram colocados individualmente no centro do aparato e tiveram sua atividade registrada durante 15 minutos. Foram analisadas a distância total percorrida e a velocidade média durante o período de observação, parâmetros utilizados para avaliação da atividade locomotora espontânea (Seibenhener; Wooten, 2015).

No teste do Nado Forçado, os animais foram submetidos ao protocolo experimental utilizado para avaliação de comportamentos associados à depressão. Durante o teste, foram registrados os tempos, em segundos, de imobilidade, climbing e swimming. O teste do nado forçado é um dos modelos comportamentais clássicos empregados na investigação pré-clínica de respostas relacionadas ao comportamento depressivo e à atividade antidepressiva (Porsolt; Le Pichon; Jalfre, 1977).

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os pressupostos para análise paramétrica foram atendidos, foram utilizadas análises de variância de uma via (ANOVA), seguidas de teste post hoc de Tukey quando apropriado. Para variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

No teste do Campo Aberto, o grupo controle apresentou mediana de 31,36 m de distância total percorrida, enquanto os grupos tratados com 250 e 500 mg/kg apresentaram medianas de 20,23 e 27,77 m, respectivamente. Embora tenha sido observada menor distância percorrida no grupo de 250 mg/kg, o teste de Kruskal-Wallis não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($H = 3,481$; $p = 0,1814$). A velocidade média apresentou comportamento semelhante. O grupo controle apresentou mediana de 0,03480 m/s, enquanto os grupos de 250 e 500 mg/kg apresentaram 0,02250 e 0,03090 m/s, respectivamente. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($H = 3,481$; $p = 0,1814$). Esses resultados indicam que o tratamento não promoveu alteração significativa da atividade locomotora espontânea. Esse achado é importante para a interpretação dos demais testes comportamentais, pois alterações importantes na locomoção poderiam interferir na avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão. Assim, apesar de uma redução numérica da distância e da velocidade no grupo de 250 mg/kg, os resultados não sustentam a ocorrência de efeito hipolocomotor nas doses avaliadas.

No Labirinto em Cruz Elevado, o número de entradas nos braços abertos apresentou mediana de 4,0 no grupo controle, 1,0 no grupo 250 mg/kg e 4,0 no grupo 500 mg/kg. O teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa entre os grupos (H = 0,4260; p = 0,8185). O tempo de permanência nos braços abertos apresentou médias de 61,05 ± 36,88 s no grupo controle, 34,78 ± 37,44 s no grupo 250 mg/kg e 76,29 ± 51,64 s no grupo 500 mg/kg. Apesar da maior média observada no grupo de 500 mg/kg e da menor média no grupo de 250 mg/kg, a ANOVA de uma via não identificou diferença estatisticamente significativa ($F(2,18) = 1,705$; $p = 0,2098$). Considerando que maior exploração dos braços abertos é geralmente associada à redução de respostas relacionadas à ansiedade no LCE, a ausência de diferenças tanto no número de entradas quanto no tempo nos braços abertos indica que o amido não produziu efeito ansiolítico estatisticamente demonstrável nas doses utilizadas. Para complementar a avaliação locomotora no LCE, foi analisado o número de entradas nos braços fechados. O grupo controle apresentou média de 7,857 ± 2,410 entradas, enquanto os grupos 250 e 500 mg/kg apresentaram 7,286 ± 4,030 e 9,857 ± 4,488 entradas, respectivamente. A ANOVA não demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F(2,18) = 0,9074$; $p = 0,4212$). Portanto, os resultados obtidos no LCE, em conjunto com aqueles observados no Campo Aberto, indicam ausência de alteração significativa da atividade locomotora. Essa ausência de efeito locomotor relevante reforça que a ausência de diferenças nos parâmetros relacionados à ansiedade não parece ser explicada por uma alteração locomotora generalizada.

No teste do Nado Forçado, o tempo de imobilidade foi utilizado como um dos principais parâmetros comportamentais. O grupo controle apresentou média de 151,8 ± 21,77 s, enquanto os grupos tratados com 250 e 500 mg/kg apresentaram médias de 184,4 ± 24,45 s e 183,8 ± 44,82 s, respectivamente. Embora os dois grupos tratados tenham apresentado valores numericamente superiores ao controle, a ANOVA não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($F(2,18) = 2,375$; $p = 0,1215$). A ausência de significância indica que o aumento numérico da imobilidade observado nos grupos tratados não é suficiente para afirmar que o amido promoveu alteração do comportamento avaliado. Além disso, o grupo de 500 mg/kg apresentou elevada variabilidade, o que pode ter contribuído para a ausência de significância estatística. O tempo de climbing apresentou medianas de 61,06 s no grupo controle, 67,29 s no grupo 250 mg/kg e 45,13 s no grupo 500 mg/kg. Como os dados não apresentaram distribuição normal em todos os grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, que não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos ($H = 1,158$; $p = 0,5809$). Para o swimming, as medianas foram de 100,4 s no grupo controle, 60,73 s no grupo 250 mg/kg e 54,91 s no grupo 500 mg/kg. O teste de Kruskal-Wallis não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($H = 5,039$; $p = 0,0771$). Entretanto, esse resultado apresenta uma tendência de diferença, com valores centrais menores nos grupos tratados em comparação ao controle. Em conjunto, os três parâmetros avaliados no Nado Forçado não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Assim, os resultados não permitem afirmar que o amido da semente de *A. heterophyllus* tenha produzido efeito antidepressivo nas condições experimentais avaliadas. A tendência observada para o swimming merece atenção em estudos posteriores,

especialmente com aumento do tamanho amostral, mas não deve ser interpretada isoladamente como evidência de efeito antidepressivo.

Considerando os três modelos comportamentais empregados, não foram identificadas alterações estatisticamente significativas que sustentem efeito ansiolítico, hipolocomotor ou antidepressivo do amido da semente de *A. heterophyllus* nas doses de 250 e 500 mg/kg. No LCE, os parâmetros diretamente relacionados à exploração dos braços abertos não foram modificados. No Campo Aberto, tanto a distância percorrida quanto a velocidade média permaneceram estatisticamente semelhantes entre os grupos. No Nado Forçado, os tempos de imobilidade e climbing não foram significativamente alterados, enquanto o swimming apresentou apenas tendência de redução nos grupos tratados. A utilização conjunta dos testes é relevante porque permite diferenciar alterações específicas de comportamento de possíveis alterações gerais na atividade motora. A ausência de diferenças no Campo Aberto e nas entradas nos braços fechados do LCE sugere que o tratamento não provocou alteração locomotora significativa que pudesse explicar os resultados observados nos demais testes. Dessa forma, a ausência de efeito nos parâmetros de ansiedade e depressão parece não estar relacionada a uma redução global da capacidade locomotora dos animais. Entretanto, a interpretação deve considerar o tamanho amostral reduzido, com sete animais por grupo, além da variabilidade observada em alguns parâmetros. Portanto, estudos futuros poderão avaliar outras doses, ampliar o tamanho amostral e investigar diferentes mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos comportamentais do amido da semente de *A. heterophyllus*.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que a administração do amido da semente de *Artocarpus heterophyllus* nas doses de 250 e 500 mg/kg não promoveu alterações estatisticamente significativas nos parâmetros relacionados à ansiedade avaliados pelo labirinto em cruz elevado. Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas na atividade locomotora, avaliada pela distância percorrida e velocidade média no campo aberto e pelas entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. No teste do nado forçado, não foram observadas diferenças significativas nos tempos de imobilidade, climbing ou swimming entre os grupos experimentais. Apesar de uma tendência de redução do swimming nos grupos tratados, esse resultado não atingiu significância estatística. Dessa forma, nas condições experimentais avaliadas, os dados não fornecem evidências suficientes para caracterizar efeitos ansiolíticos ou antidepressivos do amido da semente de *A. heterophyllus*. Estudos posteriores, com maior número de animais e diferentes doses e protocolos experimentais, poderão contribuir para uma melhor caracterização do potencial farmacológico desse composto.

Referências

AJIBOYE, B. O.; OJO, O. A.; OYINLOYE, B. E.; OKESOLA, M. A.; OLUTOSIN, A.; BOLIGON, A. A.; KAPPO, A. P. Investigation of the in vitro antioxidant potential of polyphenolic-rich extract of Artocarpus heterophyllus Lam. stem bark and its antidiabetic activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Evidence-Based Integrative Medicine, v. 25, p. 1-9, 2020.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5-TR. 5. ed., texto revisado. Porto Alegre: Artmed, 2023.

FANELLI, G.; SERRETTI, A. Depression, antidepressants, and insulin resistance: which link? European Neuropsychopharmacology, v. 60, p. 4-6, 2022.

KITTIPONGPATANA, O. S.; KITTIPONGPATANA, N. Resistant starch contents of native and heat-moisture treated jackfruit seed starch. The Scientific World Journal, v. 2015, 2015.

LAWAL, O. S.; ADEBOWALE, K. O. Physicochemical characteristics and thermal properties of chemically modified jack bean (Canavalia ensiformis) starch. Carbohydrate Polymers, v. 60, n. 3, p. 331-341, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Depression. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression. Acesso em: 16 ago. 2026.

PELLOW, S. et al. Validation of open 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, 1985.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

RATNASOORIYA, W. D.; JAYAKODY, J. R. Artocarpus heterophyllus seeds inhibits sexual competence but not fertility of male rats. Indian Journal of Experimental Biology, v. 40, n. 3, p. 304-308, 2002.

SACKEIM, H. A. The definition and meaning of treatment-resistant depression. Journal of Clinical Psychiatry, v. 62, p. 10-17, 2001.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. Journal of Visualized Experiments, n. 96, p. 52434, 2015.

CÓDIGO: SB1390

AUTOR: DANIEL PACHECO PENHA DE OLIVEIRA

COAUTOR: KATYANNA SALES BEZERRA

COAUTOR: GABRIELA DE LIMA MENEZES

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Caracterização dos perfis energéticos em interações que envolvem a sinefungina e um análogo recentemente descoberto: uma análise quântica da interação com a metiltransferase do vírus mpox

Resumo

A varíola dos macacos em apenas alguns anos rapidamente chegou a um contexto pandêmico, devido a sua alta virulência, negligência da sociedade com as medidas profiláticas e escassez de medicamentos para a forma grave da doença. Diante desse contexto de escassez de medicamentos, principalmente na forma grave da doença, o estudo de inibidores pelo ponto de vista quântico é necessário principalmente sob sua maior assertividade. Logo, analisamos as interações em complexos da enzima metiltransferase VP39 e dois fármacos diferentes: a Sinefungina e o análogo iodado UG9, devido a diferença dos ligantes, os conjuntos de bases genECP e def2-TZVP, foram empregados. Com isso, buscamos caracterizar ambos separadamente, com o objetivo de explorar e quantificar suas interações a partir da aplicação da metodologia do MFCC. Nos resultados, cálculos MFCC-DFT (M06-2X) sobre VP39 mostraram que em ambos os complexos existem aminoácidos importantes na ligação como ASP95, ARG97 e PHE 115, demonstrando a conservação de boas interações. Para além disso, interações repulsivas foram reduzidas principalmente no contexto do análogo apesar de apresentar uma energia total menor -39,25 kcal/mol(VP39-UG9) e -68.51kcal/mol(VP39-SFG). Portanto, a modificação de farmacóforos desse tipo podem mudar a afinidade e oferecer diretrizes para otimização de inibidores de ortopoxvirais, demonstrando a necessidade de mais estudos quânticos, a cerca de inibidores que poderiam ser utilizados para vírus não-relacionados.

Palavras-chave: Drug-design, In silico, Física quântica, MFCC, Varíola dos macacos

TITLE: Characterisation of energy profiles in interactions involving sinefungin and a newly discovered analogue: a quantum analysis of the interaction with the monkeypox virus methyltransferase

Abstract

Monkeypox has rapidly reached pandemic proportions in just a few years, due to its high virulence, society's neglect of preventive measures, and a shortage of medicines for the severe form of the disease. Given this context of medicine shortages, particularly for the severe form of the disease, the study of inhibitors from a quantum perspective is necessary, especially in view of their greater efficacy. We therefore analysed the interactions in complexes between the VP39 methyltransferase enzyme and two different drugs: Sinefungin and the iodinated analogue UG9. Owing to the difference in ligands, the genECP and def2-TZVP base sets were employed. We thus sought to characterise both complexes separately, with the aim of exploring and quantifying their interactions using the MFCC methodology. The results showed that MFCC-DFT (M06-2X) calculations on VP39 revealed that, in both complexes, key amino acids involved in binding—such as ASP95, ARG97 and PHE115—were present, demonstrating the conservation of favourable interactions. Furthermore, repulsive interactions were reduced, particularly in the context of the analogue, despite it exhibiting a lower total energy of –39.25 kcal/mol (VP39-UG9) and –68.51 kcal/mol (VP39-SFG). Therefore, modifying such pharmacophores may alter affinity and provide guidelines for the optimisation of orthopoxvirus inhibitors, highlighting the need for further quantum studies on inhibitors that could be used against unrelated viruses.

Keywords: Drug-Design, In silico, Quantum phyisics, MFCC, Monkeypox

Introdução

O Monkeypox virus (MPXV), um vírus de DNA pertencente ao gênero Orthopoxvirus da família Poxviridae, é responsável pela mpox, doença que ganhou relevância global após o surto iniciado em 2022, caracterizado por transmissão sustentada entre humanos e disseminação internacional (Mitjà et al., 2023; Sah et al., 2022). No entanto, apesar da rápida mobilização de vacinas contra varíola e MPXV e da redução significativa do pico epidêmico em 2024 (OMS, 2024), a disponibilidade limitada de terapias antivirais específicas permanece um desafio (Lu et al., 2023), principalmente para indivíduos imunossuprimidos e casos graves da doença (Shishido; Street, 2023). Clinicamente, a mpox apresenta manifestações predominantemente cutâneas e maior risco de gravidade em indivíduos imunossuprimidos. Nesse contexto, a replicação viral depende de proteínas específicas que representam potenciais alvos para intervenção terapêutica (Zhao et al., 2016; Alakunle et al., 2020). Entre as proteínas associadas à evasão imunológica viral, a metiltransferase VP39 destaca-se por converter a extremidade 5' cap-0 em cap-1 no mRNA viral, contribuindo para a evasão do reconhecimento antiviral mediado por sensores da imunidade inata, como RIG-I e IFIT1 (Kim et al., 2020). Devido à sua importância funcional e conservação estrutural entre Orthopoxvirus, a VP39 representa um alvo promissor para descoberta e caracterização de moléculas inibidoras. A atividade catalítica da VP39 depende de uma região conservada responsável pelo reconhecimento do cofator S-adenosil-homocisteína (SAH), envolvendo resíduos como LYS41, ASP138, LYS175 e GLU218, cuja conservação evidencia sua relevância para o reconhecimento molecular. Entre os compostos descritos para interação com a VP39, a sinefungina (SFG), análogo estrutural da S-adenosilmetionina (SAM), apresenta potencial inibitório por mimetizar o cofator natural e interagir no sítio catalítico da enzima. Além disso, modificações estruturais desse

farmacóforo, como o análogo iodado UG9 descrito por Silhan et al. (2023), representam estratégias relevantes para explorar alterações nas propriedades eletrônicas e energéticas das interações proteína–ligante. Moléculas de água presentes no sítio catalítico podem atuar como mediadoras dessas interações, reforçando a necessidade de abordagens capazes de caracterizar efeitos intermoleculares com maior precisão (Samways et al., 2021; Silhan et al., 2023). Nesse contexto, a caracterização detalhada das energias de interação entre VP39 e seus ligantes torna-se essencial. A teoria do funcional da densidade (DFT) permite avaliar propriedades eletrônicas e energéticas fundamentais das interações intermoleculares, enquanto métodos de fragmentação quântica, como o Molecular Fractionation with Conjugate Caps (MFCC), possibilitam a aplicação desses cálculos em sistemas biomoleculares complexos, determinando contribuições energéticas individuais de resíduos de aminoácidos envolvidos na estabilização proteína–ligante (Vornweg; Jacob, 2024). Dessa maneira, métodos quântico-mecânicos permitem superar limitações dos modelos clássicos ao considerar propriedades eletrônicas essenciais, como distribuição de carga, polarização e componentes atrativos e repulsivos das interações intermoleculares (Niazi, 2025). Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar, sob uma perspectiva quântico-mecânica, as interações entre a metiltransferase VP39 do MPXV e os ligantes sinefungina e UG9. Para isso, foram aplicados cálculos DFT associados ao método MFCC, permitindo determinar contribuições energéticas individuais de resíduos de aminoácidos, interações favoráveis e desfavoráveis e fatores eletrônicos envolvidos na estabilização dos complexos proteína–ligante, fornecendo informações estruturais e energéticas para compreender determinantes moleculares associados à otimização de futuros inibidores contra ortopoxvírus.

Metodologia

Foram caracterizadas as interações entre a metiltransferase VP39 do Monkeypox virus (MPXV) e dois ligantes de interesse antiviral, a sinefungina (SFG) e o análogo iodado TO1119 (UG9), por meio de cálculos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) associados ao método de Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (Molecular Fractionation with Conjugate Caps – MFCC). As estruturas cristalográficas dos complexos VP39–UG9 e VP39–SFG foram obtidas no repositório Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB-PDB), correspondentes aos códigos 8CEV e 8B07, respectivamente, apresentando resoluções de 2,14 Å e 2,05 Å (Silhan et al., 2023). Inicialmente, as estruturas cristalográficas foram avaliadas quanto à presença de resíduos ausentes ou regiões incompletas. A reconstrução dos resíduos faltantes foi realizada utilizando o software MODELLER (versão 10.7), integrado ao ChimeraX (versão 1.9), por meio de modelagem estrutural baseada em homologia. Foram reconstruídos 28 resíduos ausentes na cadeia A da estrutura 8CEV e 24 resíduos ausentes na cadeia A da estrutura 8B07. Posteriormente, os átomos de hidrogênio ausentes nas estruturas cristalográficas foram adicionados utilizando o Discovery Studio (versão 3.1), considerando parâmetros do campo de força CHARMM (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics). A definição dos estados de protonação dos sistemas foi realizada considerando o pH 8,0 utilizado na caracterização cristalográfica dos complexos VP39–ligante descritos por Silhan et al. (2023). As estruturas dos ligantes foram avaliadas utilizando o MarvinSketch, enquanto os estados de protonação dos resíduos proteicos foram estimados pelo servidor PROPKA. Não foram observadas alterações nos estados de protonação dos resíduos carregados da

proteína. Para os ligantes, ambos apresentaram o grupo carboxila ionizado negativamente (-1), enquanto a SFG apresentou um grupo amina protonado (+1), característica ausente no UG9 devido à modificação estrutural correspondente. Após a preparação estrutural, foram mantidos nos sistemas os resíduos envolvidos diretamente nas interações proteína–ligante, bem como moléculas de água conservadas no sítio catalítico, visando preservar componentes relevantes do ambiente molecular durante os cálculos. O método MFCC foi empregado para decompor a macromolécula em fragmentos correspondentes aos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com os ligantes. Nesse procedimento, as ligações peptídicas são fragmentadas e as valências livres são completadas por capas conjugadas, preservando o ambiente químico local e permitindo a determinação das contribuições energéticas individuais de cada resíduo. Os ligantes foram definidos como L, sendo a SFG no complexo 8B07 e o UG9 no complexo 8CEV, enquanto os resíduos da VP39 foram representados como Ri. A energia de interação entre cada fragmento e o ligante foi determinada pela equação: $E(L-Ri)=E(L-Ci-1RiCi+1)-E(L-Ci-1Ci+1)-E(Ci-1RiCi+1)+E(Ci-1Ci+1)$ onde $E(L-Ci-1RiCi+1)$ representa a energia do sistema contendo o ligante, o resíduo e as capas conjugadas; $E(L-Ci-1Ci+1)$ corresponde à energia do ligante com as capas; $E(Ci-1RiCi+1)$ representa a energia do fragmento contendo o resíduo e suas capas; e $E(Ci-1Ci+1)$ corresponde à energia das capas conjugadas isoladas. Os cálculos de energia eletrônica foram realizados utilizando a Teoria do Funcional da Densidade implementada no software Gaussian 09. O funcional híbrido meta-GGA M06-2X foi empregado devido ao seu desempenho previamente descrito na caracterização de interações não covalentes em sistemas biomoleculares (Hohenstein et al., 2008; Riley; Hobza, 2011). Para o complexo VP39–UG9 (8CEV), foi utilizado o conjunto de bases def2-TZVP para os átomos presentes no sistema proteína–ligante. Devido à presença do átomo de iodo na estrutura do UG9, os parâmetros correspondentes a esse elemento foram obtidos por meio da plataforma Basis Set Exchange (BSE), uma biblioteca padronizada para disponibilização de conjuntos de bases em diferentes formatos computacionais (Pritchard et al., 2019), e incorporados manualmente aos arquivos de entrada do Gaussian 09, permitindo a adequada descrição das propriedades eletrônicas desse átomo durante os cálculos. Para o complexo VP39–SFG (8B07), os cálculos de energia de interação foram realizados utilizando o funcional M06-2X associado ao conjunto de bases 6-311+G(d,p), permitindo a caracterização energética das contribuições dos resíduos envolvidos na estabilização do complexo. Considerando a natureza aquosa do sítio catalítico, os efeitos do ambiente dielétrico foram avaliados utilizando o modelo de solvatação implícita SMD (Solvation Model based on Density), considerando constantes dielétricas de $\varepsilon = 20$ e $\varepsilon = 40$, permitindo investigar a influência do meio eletrostático sobre as energias de interação dos complexos (Marenich; Cramer; Truhlar, 2009). A energia total de interação foi obtida pela soma das contribuições energéticas individuais dos resíduos, possibilitando a identificação dos aminoácidos com maior participação na estabilização dos complexos proteína–ligante. Adicionalmente, foi realizada a análise da convergência energética em função da distância ao ligante. Para isso, foram definidas esferas concêntricas hipotéticas ao redor dos ligantes, considerando incrementos progressivos de raio ($r=n/2$, onde $n = 1,2,3,4...$), permitindo avaliar a contribuição acumulativa dos resíduos presentes em diferentes regiões do sítio de interação e determinar a estabilização energética dos complexos.

Resultados e Discussões

A organização estrutural dos ligantes foi analisada considerando três regiões quimicamente relevantes: a base purínica ou 7-deaza-purínica (I), a região central semelhante à ribose (II) e a cauda correspondente ao aminoácido (III). Essa divisão permite relacionar as contribuições energéticas obtidas pelo MFCC às diferentes porções dos ligantes e facilita a interpretação dos resíduos envolvidos na estabilização dos complexos (Figura 1). No UG9, a região I contém a modificação 7-deaza associada ao átomo de iodo, enquanto a SFG mantém o núcleo adenínico correspondente. As regiões II e III apresentar cargas totais diferentes (+1 para SFG e nula para UG9), preservam características estruturais comuns aos análogos de SAM, permitindo avaliar a conservação do reconhecimento molecular pela VP39 (Figura 1). As estruturas cristalográficas demonstraram que ambos os ligantes ocupam a cavidade de ligação ao cofator S-adenosilmetionina (SAM) da VP39. A estrutura da enzima apresenta arquitetura do tipo Rossmann, com uma cavidade central responsável pelo reconhecimento de SFG e seus análogos. No complexo VP39–SFG, a região adenínica encontra-se inserida em um cânion predominantemente hidrofóbico formado por resíduos como PHE115, VAL116, VAL139 e LEU159, enquanto as regiões ribose e aminoácido estabelecem contatos polares com resíduos do sítio catalítico. Essa organização é consistente com a estrutura cristalográfica descrita para a VP39, na qual a SFG ocupa diretamente o sítio de ligação do SAM (Figura 2). A representação estrutural do UG9 evidencia que a introdução do átomo de iodo ocorre na região 7-deaza da base, posicionando esse substituinte próximo à cavidade adjacente ao núcleo purínico (Figura 2). Essa localização é particularmente relevante porque essa região da VP39 apresenta uma rede de moléculas de água descrita experimentalmente como associada à adenina da SFG e aos resíduos VAL116, GLU118 e ASN156. A estratégia estrutural empregada para o desenvolvimento dos análogos de VP39 base ou-se justamente na possibilidade de modificar a posição N7 da adenina para explorar essa cavidade ((Hodel et al., 1996; Silhan et al., 2023; Skvara et al., 2023). A análise da energia acumulada em função do raio ao redor dos ligantes permitiu determinar a extensão espacial necessária para representar de maneira estável as interações dos complexos. Para o complexo VP39–SFG, observa-se uma redução acentuada da energia entre 2,0 e 4,5 Å, passando de aproximadamente -29,56 kcal/mol para -65,94 kcal/mol em ε= 40 (Figura 3A). Posteriormente, as variações tornam-se menores, com a energia permanecendo próxima de -68 kcal/mol entre 7,0 e 10,0 Å. Em ε = 20, o mesmo comportamento geral é observado, embora com contribuições energéticas mais intensas, atingindo aproximadamente -81,20 kcal/mol no raio final (Figura 3A). Para o complexo VP39–UG9, a convergência apresenta comportamento semelhante, porém com magnitude energética distinta. Em ε = 40, a energia acumulada evolui de -18,09 kcal/mol em 2,0 Å para -39,06 kcal/mol em 3,5 Å, permanecendo posteriormente próxima de -39 kcal/mol até 10 Å, quando alcança -39,25 kcal/mol. Em ε = 20, a energia final foi aproximadamente -43,80 kcal/mol (Figura 3B). A estabilização mais expressiva ocorre, portanto, nos primeiros raios, entre 3,5–4,5 Å em ambos os complexos, enquanto os resíduos localizados em regiões mais externas apresentam contribuições menores e produzem apenas pequenas alterações no perfil acumulativo. Esse comportamento indica que a maior parcela da interação calculada está concentrada na vizinhança imediata dos ligantes como registrado em trabalhos anteriores (Matias, 2025). A diferença entre os perfis obtidos em ε = 20 e ε = 40 demonstra a influência do tratamento dielétrico sobre a magnitude das interações eletrostáticas. O uso de um meio com menor constante dielétrica permite maior expressão das contribuições eletrostáticas, enquanto ε = 40 proporciona maior blindagem dessas interações. Assim, a

diferença entre os dois tratamentos deve ser interpretada como uma avaliação da sensibilidade do sistema ao ambiente dielétrico adotado, e não como dois valores independentes de afinidade. A decomposição energética por resíduo demonstrou que a estabilização da SFG é predominantemente determinada por um conjunto restrito de resíduos do sítio de ligação (Tabela 1; Figura 4A). Em ε = 40, os maiores valores atrativos foram observados para ASP95 (-10,410 kcal/mol), ASP138 (-9,613 kcal/mol), VAL139 (-7,649 kcal/mol), PHE115 (-5,290 kcal/mol), GLY68 (-3,727 kcal/mol) e VAL116 (-3,244 kcal/mol). Esse padrão é consistente com a organização estrutural previamente descrita para a SFG, na qual a região adenínica é acomodada pelo ambiente hidrofóbico formado principalmente por PHE115, VAL116, VAL139 e LEU159, enquanto a região ribose interage com ASP95 e ARG97 (Silhan et al., 2023) (Figura 4A). O ASP95 apresentou a maior contribuição atrativa do complexo, indicando sua importância para a estabilização da região polar da SFG. Esse resultado está de acordo com a disposição espacial observada na estrutura cristalográfica, na qual os grupos hidroxila da ribose participam do reconhecimento molecular por meio de contatos com ASP95 e ARG97. A forte contribuição energética desse resíduo demonstra que a interação não depende apenas do encaixe da base purínica, mas também da estabilização da região central do ligante (Figura 5). O ASP138 apresentou contribuição igualmente expressiva, destacando sua participação no reconhecimento da região aminoácida do ligante. Embora seja associado à região catalítica da VP39, o resultado demonstra que sua importância energética no complexo está relacionada também à interação direta com o ligante. Dessa forma, o MFCC permite distinguir a relevância funcional do resíduo de sua contribuição energética específica no complexo estudado (Figura 5). A contribuição de VAL139 (-7,649 kcal/mol) reforça a importância do ambiente hidrofóbico que acomoda a região adenínica. Já PHE115 apresentou -5,290 kcal/mol, confirmando a participação do ambiente aromático no reconhecimento da base. A proximidade desse valor com a contribuição observada para UG9 indica que esse componente do reconhecimento molecular permanece particularmente conservado entre os dois complexos (Figura 5). Os resíduos GLY68 e VAL116 (-3,727 e -3,244 kcal/mol, respectivamente) também apresentaram contribuições atrativas relevantes, indicando que o ambiente próximo à base purínica participa da estabilização do ligante. Em conjunto, esses resultados caracterizam a SFG como um ligante cuja estabilização energética está fortemente associada à combinação entre resíduos polares da região catalítica e resíduos hidrofóbicos que acomodam o núcleo adenínico (Figura 5). No complexo VP39–UG9, os principais resíduos em ε = 40 foram ASP95 (-5,786 kcal/mol), PHE115 (-5,340 kcal/mol), ASP138 (-4,637 kcal/mol), ARG97 (-4,506 kcal/mol), GLY68 (-3,822 kcal/mol), ARG140 (-3,414 kcal/mol), VAL139 (-2,686 kcal/mol), GLY72 (-2,359 kcal/mol), ALA70 (-1,964 kcal/mol) e ARG143 (-1,801 kcal/mol). A distribuição dessas contribuições evidencia que a interação do análogo com o sítio ocorre por meio de uma rede energética distribuída entre regiões polares, carregadas e hidrofóbicas do sítio (Tabela 2; Figura 4B). O ASP95 novamente aparece entre os principais determinantes, indicando a conservação da região de reconhecimento da ribose. Entretanto, sua contribuição no UG9 é menor em magnitude que aquela observada para a SFG. O mesmo comportamento é observado para ASP138, que permanece favorável, mas apresenta contribuição menos intensa no complexo com UG9. Esses resultados sugerem que a modificação estrutural do ligante altera a distribuição das interações locais sem eliminar o reconhecimento pelos resíduos centrais da cavidade (Figura 6). Em contraste, ARG97 apresentou contribuição mais favorável no complexo com UG9, alcançando -4,506 kcal/mol, enquanto na SFG sua contribuição foi de -1,230 kcal/mol. Essa alteração evidencia que a modificação do ligante pode

redistribuir as contribuições energéticas entre resíduos vizinhos, mesmo quando a orientação geral do ligante permanece conservada. A participação de ARG140 também se torna mais pronunciada no UG9, contribuindo com -3,414 kcal/mol (Figura 6). Um dos resultados mais relevantes é a contribuição praticamente equivalente de PHE115 nos dois complexos: -5,290 kcal/mol para SFG e -5,340 kcal/mol para UG9. Esse resultado demonstra que a região responsável pela acomodação da base permanece energeticamente preservada após a substituição estrutural 7-deaza. Assim, a introdução do iodo não parece comprometer o reconhecimento do núcleo aromático pela região hidrofóbica da VP39 (Figura 6). A contribuição semelhante de GLY68, com -3,727 kcal/mol na SFG e -3,822 kcal/mol no UG9, reforça essa interpretação. Portanto, embora as magnitudes das contribuições de alguns resíduos polares sejam modificadas, determinados componentes do reconhecimento da base permanecem energeticamente conservados (Figura 6). As estruturas de interação fornecem suporte estrutural aos resultados obtidos pela decomposição energética. No complexo VP39–UG9, são observados contatos próximos envolvendo PHE115 e VAL116 na região da base 7-deaza, enquanto ARG97 participa da estabilização da região central do ligante. ASP95 estabelece contatos próximos à região ribose e ASP138 permanece associado à extremidade aminoácida do ligante (Figura 6). As distâncias representadas nas estruturas, em conjunto com as contribuições MFCC, demonstram que os resíduos energeticamente relevantes estão espacialmente concentrados ao redor das três regiões estruturais previamente definidas. Dessa maneira, a decomposição energética não apenas identifica resíduos com contribuição atrativa, mas permite associar quantitativamente esses resíduos às regiões químicas responsáveis pelo reconhecimento molecular. Também foram identificadas contribuições positivas, especialmente de GLY96 (+0,684 kcal/mol em $\varepsilon = 40$), indicando que nem todos os contatos próximos são necessariamente estabilizadores. Esse resultado é importante porque demonstra a coexistência de componentes favoráveis e desfavoráveis no complexo. A energia líquida de interação resulta justamente do balanço dessas contribuições, e não apenas da soma dos contatos considerados favoráveis por critérios geométricos. Essa característica reforça a importância do MFCC-DFT para a caracterização proposta, uma vez que interações intermoleculares podem apresentar componentes atrativos e repulsivos que não são adequadamente representados por uma simples análise geométrica. A descrição quântica permite, portanto, identificar quais resíduos efetivamente contribuem para a estabilização energética do complexo e quais representam penalidades locais. A análise conjunta dos dois complexos evidencia um núcleo energético compartilhado formado principalmente por ASP95, ASP138, PHE115 e GLY68. Entre esses resíduos, PHE115 apresentou a maior conservação quantitativa, com contribuições de -5,290 kcal/mol para SFG e -5,340 kcal/mol para UG9. Essa proximidade demonstra que a região aromática da cavidade mantém sua função de reconhecimento mesmo após a modificação estrutural do núcleo purínico. GLY68 apresenta comportamento semelhante, com diferença de apenas 0,095 kcal/mol entre os complexos, reforçando a conservação do ambiente que circunda a base. A modificação 7-deaza-iodo, entretanto, está associada a uma redistribuição das contribuições energéticas. Enquanto a SFG apresenta forte contribuição de ASP95, ASP138 e VAL139, o UG9 apresenta maior participação relativa de ARG97 e ARG140. Esse resultado sugere que a alteração química não simplesmente fortalece ou enfraquece uma única interação, mas modifica a distribuição espacial e eletrônica das forças que estabilizam o complexo. A presença do iodo é particularmente relevante nesse contexto. Apesar de não haver interações visíveis ou contabilizadas pelos métodos no cristal 8CEV, UG9 demonstrou influência na distribuição da rede de águas no bolsão em testes experimentais (Silhan et al., 2023).

Átomos de halogênio pesados, especialmente iodo, apresentam elevada polarizabilidade e podem participar de interações direcionais ou contribuir por componentes eletrostáticos e dispersivos. Entretanto, a existência de um átomo de iodo próximo a uma cavidade proteica não é suficiente para caracterizar uma ligação de halogênio. Essa interação requer análise específica da geometria e da distribuição eletrônica, incluindo a orientação em relação ao eixo C–I e a presença de um aceitador apropriado. Estudos de química medicinal demonstram que os efeitos de halogenação em complexos proteína–ligante podem envolver simultaneamente componentes eletrostáticos, dispersivos e de transferência de carga, além de efeitos estéricos (Wilcken et al., 2012; Margiotta et al., 2020). Portanto, os resultados presentes permitem afirmar que o átomo de iodo está associado a uma modificação do ambiente energético local do UG9, mas não permitem atribuir isoladamente ao iodo uma determinada contribuição energética nem classificá-la como ligação de halogênio. Para essa determinação seriam necessários cálculos específicos de decomposição energética ou análise de propriedades eletrônicas do contato envolvendo o iodo. A organização estrutural observada no sítio de ligação também deve ser interpretada considerando a presença de moléculas de água. O estudo cristalográfico de VP39 demonstrou que a região adjacente à adenina da SFG contém uma rede de águas conectadas ao ligante e aos resíduos VAL116, GLU118 e ASN156. A introdução de substituintes na posição 7-deaza foi proposta justamente para explorar essa cavidade e alterar as interações estabelecidas com essa rede (Silhan et al., 2023). A importância das águas do sítio não se restringe à formação de pontes de hidrogênio. Moléculas confinadas em cavidades proteicas podem apresentar mobilidade e organização diferentes das observadas no solvente, de modo que sua substituição ou reorganização pode alterar componentes entálpicos e entrópicos da ligação. Estudos de reconhecimento proteína–ligante demonstram que águas estruturais podem atuar como mediadoras de interações ou ser deslocadas pela modificação de ligantes, influenciando a termodinâmica da associação (Matter; Güssregen, 2018; Matricon et al., 2020; Samways et al., 2022). No presente estudo, a análise MFCC-DFT preserva as águas consideradas relevantes na preparação estrutural, permitindo que suas contribuições sejam incorporadas ao ambiente molecular analisado. A presença de GLU118 entre os resíduos considerados no entorno do UG9, embora com contribuição energética pequena em $\varepsilon = 40$ (-0,025 kcal/mol), demonstra que a simples proximidade de um resíduo associado à rede de hidratação não implica necessariamente uma grande contribuição energética direta. Isso é particularmente importante para evitar a interpretação de que toda água estruturalmente conservada ou todo resíduo próximo à cavidade produz obrigatoriamente forte estabilização direta. Assim, os resultados são compatíveis com a hipótese de que a substituição 7-deaza-iodo altera o ambiente local da cavidade de hidratação, mas não permitem quantificar o ganho entrópico decorrente da liberação de águas para o solvente. Tal conclusão exigiria métodos capazes de avaliar explicitamente a dinâmica e a termodinâmica da hidratação, como simulações de dinâmica molecular com análise de sítios de hidratação ou métodos específicos de energia livre. A literatura recente reforça que a reorganização de redes de água deve ser considerada conjuntamente, pois o deslocamento de uma molécula pode ser compensado ou acompanhado pela reorganização de outras moléculas da rede (Samways et al., 2022; Rudling; Orro; Carlsson, 2018). A caracterização realizada demonstra que o reconhecimento da VP39 por SFG e UG9 é sustentado por um conjunto de interações conservadas, mas energeticamente distribuídas de maneira distinta entre os complexos. A presença recorrente de ASP95, ASP138, PHE115 e GLY68 entre os principais determinantes evidencia um núcleo molecular associado ao reconhecimento do sítio SAM. Ao mesmo tempo, a alteração das contribuições de

ARG97, ARG140, VAL139 e outros resíduos demonstra que modificações estruturais no ligante podem reorganizar a distribuição das interações sem necessariamente alterar sua orientação global. A utilização do funcional M06-2X é igualmente relevante para esse tipo de análise, uma vez que esse funcional foi avaliado especificamente quanto à descrição de interações não covalentes importantes em sistemas biomoleculares. Hohenstein et al. demonstraram seu desempenho na descrição de interações envolvendo bases nucleicas, destacando sua capacidade de representar interações intermoleculares relevantes para sistemas biomoleculares (Hohenstein; Chill; Sherrill, 2008). Nesse contexto, os resultados obtidos não devem ser interpretados apenas como uma classificação de qual ligante apresenta maior energia de interação. O principal resultado consiste na caracterização dos determinantes energéticos responsáveis pela associação de cada complexo, permitindo identificar quais regiões do ligante permanecem reconhecidas pela VP39 e quais modificações promovem redistribuição das interações. Essa informação é relevante para estratégias futuras de otimização racional, nas quais alterações estruturais podem ser direcionadas para conservar interações essenciais e explorar regiões adicionais da cavidade. Embora o complexo VP39–UG9 apresente energia acumulada de aproximadamente -39,25 kcal/mol em ε = 40 e o VP39–SFG alcance aproximadamente -68,22 kcal/mol no mesmo tratamento dielétrico, esses valores não devem ser utilizados isoladamente para estabelecer uma hierarquia quantitativa de afinidade, especialmente porque os complexos foram descritos com diferentes conjuntos de bases. O resultado mais consistente é a identificação de padrões de interação conservados e de diferenças na distribuição energética dos resíduos. Essa distinção é fundamental porque a afinidade experimental resulta de um balanço entre interações favoráveis, dessolvatação, reorganização estrutural e entropia, enquanto o presente estudo concentra-se na caracterização quântico-mecânica das interações no complexo preparado (Gallicchio; Levy, 2011; Grinter; Zou, 2014). Dessa forma, é possível concluir que os cálculos demonstram os resíduos: ASP95, ASP138, PHE115 e GLY68 como elementos importantes do reconhecimento da VP39, enquanto a modificação da 7-deaza-iodo (região i) presente no UG9 está associada à redistribuição das contribuições energéticas, particularmente envolvendo ARG97 e ARG140. A alteração da forma de contribuição de PHE115 sugere preservação do reconhecimento da região purínica, enquanto as alterações observadas nos resíduos polares indicam mudanças no ambiente eletrônico e na organização local das interações. Esses achados fornecem uma caracterização molecular capaz de orientar a investigação de novos análogos da SFG e do UG9 e reforçam a aplicabilidade de métodos quântico-mecânicos na identificação de determinantes energéticos relevantes para a otimização de inibidores de metiltransferases virais.

Conclusão

Os resultados obtidos dessa pesquisa demonstraram que a aplicação integrada do DFT junto a técnica de MFCC permitiu caracterizar, em nível quântico-mecânico, as interações estabelecidas entre a metiltransferase VP39 do Monkeypox virus e os ligantes sinefungina (SFG) e seu análogo iodado UG9. A análise de convergência indicou que as principais contribuições energéticas estão concentradas na região próxima ao sítio de ligação, com convergência até aproximadamente 4–5 Å e variações reduzidas em regiões mais distantes. A decomposição energética evidenciou um núcleo de reconhecimento compartilhado entre os complexos, principalmente envolvendo ASP95, ASP138, PHE115 e GLY68. Na SFG, destacaram-se as contribuições de

ASP95 (-10,410 kcal/mol), ASP138 (-9,613 kcal/mol), VAL139 (-7,649 kcal/mol) e PHE115 (-5,290 kcal/mol), enquanto no UG9 foram observadas contribuições relevantes de ASP95 (-5,786 kcal/mol), PHE115 (-5,340 kcal/mol), ASP138 (-4,637 kcal/mol), ARG97 (-4,506 kcal/mol) e GLY68 (-3,822 kcal/mol). A contribuição semelhante de PHE115 e GLY68 nos dois complexos indica a conservação de elementos importantes para o reconhecimento da região purínica, enquanto as diferenças observadas em resíduos polares e carregados demonstram que a modificação estrutural do UG9 reorganiza o perfil energético das interações com a VP39. A diferença no estado de carga dos ligantes também se mostrou relevante para a interpretação dos resultados. A SFG, considerada como cátion monovalente (+1), apresentou maior magnitude energética global em ε = 40, aproximadamente -68,2 kcal/mol, enquanto o UG9, de carga neutra, apresentou aproximadamente -39,3 kcal/mol. Esses valores evidenciam diferentes perfis de interação, mas não devem ser interpretados isoladamente como medidas de afinidade experimental, uma vez que fatores como dessolvatação, entropia, flexibilidade molecular e reorganização do solvente não são integralmente contemplados pelo modelo empregado. A presença do grupo 7-deaza-iodo no UG9 demonstrou-se relevante para a modificação do ambiente químico da região purínica, sem comprometer a contribuição de resíduos associados ao reconhecimento dessa região. Dessa forma, o estudo fornece informações estruturais e energéticas sobre os determinantes moleculares da interação com a VP39, contribuindo para a compreensão de modificações químicas capazes de reorganizar o reconhecimento de inibidores. Como perspectiva, estudos posteriores envolvendo simulação computacional em sistemas biológicos, avaliando a influência da flexibilidade proteica, da hidratação e dos efeitos entrópicos. A caracterização quântico-mecânica realizada contribui, portanto, para estratégias de otimização racional de moléculas antivirais, alinhando-se ao ODS 3. Por fim, os resultados obtidos nesta pesquisa constituem a base de um artigo científico que se encontra atualmente em processo de submissão a uma revista científica, visando à disseminação dos achados e à sua avaliação pela comunidade acadêmica.

Referências

MITJÀ, Oriol et al. Monkeypox. The Lancet, v. 401, n. 10370, p. 60-74, 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02075-X. SAH, Ranjit et al. The emergence of monkeypox: a global health threat. Cureus, v. 14, n. 9, e29304, 2022. DOI: 10.7759/cureus.29304. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mpox. Geneva: World Health Organization, 26 ago. 2024. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mpox. Acesso em: 30 ago. 2026. LU, Junjie et al. Mpox (formerly monkeypox): pathogenesis, prevention and treatment. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 8, art. 458, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01675-2. SHISHIDO, Akira A.; STREET, Stacy. Optimal management of severe mpox in patients with uncontrolled human immunodeficiency virus. Journal of Medical Virology, v. 95, e29277, 2023. DOI: 10.1002/jmv.29277. ZHAO, Kun; WOHLHUETER, Robert M.; LI, Yu. Finishing monkeypox genomes from short reads: assembly analysis and a neural network method. BMC Genomics, v. 17, art. 497, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2826-8. ALAKUNLE, Emmanuel et al. Monkeypox virus in Nigeria: infection biology, epidemiology, and evolution. Viruses, v. 12, n. 11, art. 1257, 2020. DOI: 10.3390/v12111257. KIM, Geon-Woo; IMAM, Hasan; KHAN, Mohsin; SIDDIQUI, Aleem. N6-Methyladenosine modification of hepatitis B and C viral RNAs attenuates

host innate immunity via RIG-I signaling. Journal of Biological Chemistry, v. 295, n. 37, p. 13123-13133, 2020. DOI: 10.1074/jbc.RA120.014260. SILHAN, Jan et al. Discovery and structural characterization of monkeypox virus methyltransferase VP39 inhibitors reveal similarities to SARS-CoV-2 nsp14 methyltransferase. Nature Communications, v. 14, art. 2259, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-38019-1. SAMWAYS, Marley L.; TAYLOR, Richard D.; BRUCE MACDONALD, Hannah E.; ESSEX, Jonathan W. Water molecules at protein-drug interfaces: computational prediction and analysis methods. Chemical Society Reviews, v. 50, p. 9104-9120, 2021. DOI: 10.1039/D0CS00151A. VORNWEG, Johannes R.; JACOB, Christoph R. Protein-ligand interaction energies from quantum-chemical fragmentation methods: upgrading the MFCC-scheme with many-body contributions. The Journal of Physical Chemistry B, v. 128, n. 47, p. 11597-11606, 2024. DOI: 10.1021/acs.jpcb.4c05645. NIAZI, Sarfaraz K. Quantum mechanics in drug discovery: a comprehensive review of methods, applications, and future directions. International Journal of Molecular Sciences, v. 26, n. 13, art. 6325, 2025. DOI: 10.3390/ijms26136325. HOHENSTEIN, Edward G.; CHILL, Samuel T.; SHERRILL, C. David. Assessment of the performance of the M05-2X and M06-2X exchange-correlation functionals for noncovalent interactions in biomolecules. Journal of Chemical Theory and Computation, v. 4, n. 12, p. 1996-2000, 2008. DOI: 10.1021/ct800308k. RILEY, Kevin E.; HOBZA, Pavel. Noncovalent interactions in biochemistry. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, v. 1, n. 1, p. 3-17, 2011. DOI: 10.1002/wcms.8. PRITCHARD, Benjamin P.; ALTARAWY, Doaa; DIDIER, Brett; GIBSON, Tara D.; WINDUS, Theresa L. New Basis Set Exchange: an open, up-to-date resource for the molecular sciences community. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 59, n. 11, p. 4814-4820, 2019. DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00725. MARENICH, Aleksandr V.; CRAMER, Christopher J.; TRUHLAR, Donald G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. The Journal of Physical Chemistry B, v. 113, n. 18, p. 6378-6396, 2009. DOI: 10.1021/jp810292n. HODEL, Andrea E.; GERSHON, Paul D.; SHI, Xiang; QUIOCHO, Florante A. The 1.85 Å structure of vaccinia protein VP39: a bifunctional enzyme that participates in the modification of both mRNA ends. Cell, v. 85, n. 2, p. 247-256, 1996. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81101-0. SKVARA, Petr; CHALUPSKA, Dominika; KLIMA, Martin; KOZIC, Jan; SILHAN, Jan; BOURA, Evzen. Structural basis for RNA-cap recognition and methylation by the mpox methyltransferase VP39. Antiviral Research, v. 216, art. 105663, 2023. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105663. MATIAS, Érika Geicianny de Carvalho et al. Quantum biochemical analysis of the TtgR regulator and effectors. Scientific Reports, v. 14, art. 8519, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-58441-9. WILCKEN, Rainer; ZIMMERMANN, Markus O.; LANGE, Andreas; JOERGER, Andreas C.; BOECKLER, Frank M. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. Journal of Medicinal Chemistry, v. 56, n. 4, p. 1363-1388, 2013. DOI: 10.1021/jm3012068. MARGIOTTA, Enrico et al. Halogen bonds in ligand-protein systems: molecular orbital theory for drug design. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 60, n. 3, p. 1317-1328, 2020. DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00946. MATTER, Hans; GÜSSREGEN, Stefan. Characterizing hydration sites in protein-ligand complexes towards the design of novel ligands. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 28, n. 14, p. 2343-2352, 2018. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.05.061. MATRICON, Pierre et al. Ligand design by targeting a binding site water. Chemical Science, v. 12, p. 960-968, 2021. DOI: 10.1039/D0SC04938G. SAMWAYS, Marley L.; BRUCE MACDONALD, Hannah E.;

TAYLOR, Richard D.; ESSEX, Jonathan W. Water networks in complexes between proteins and FDA-approved drugs. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 63, n. 1, p. 387-396, 2023. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c01225. RUDLING, Axel; ORRO, Adolfo; CARLSSON, Jens. Prediction of ordered water molecules in protein binding sites from molecular dynamics simulations: the impact of ligand binding on hydration networks. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 58, n. 2, p. 350-361, 2018. DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00520. GALLICCHIO, Emilio; LEVY, Ronald M. Recent theoretical and computational advances for modeling protein-ligand binding affinities. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, v. 85, p. 27-80, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-386485-7.00002-8. GRINTER, Sam Z.; ZOU, Xiaoqin. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. Molecules, v. 19, n. 7, p. 10150-10176, 2014. DOI: 10.3390/molecules190710150.

CÓDIGO: SB1395

AUTOR: JOSIAS SAMUEL MELO RIBEIRO

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Avaliação do potencial imunoadjuvante de nanopartículas de quitosana associadas à peçonha de Bothrops leucurus

Resumo

A serpente Bothrops leucurus é uma das principais responsáveis por acidentes ofídicos no Nordeste brasileiro, causando severas lesões teciduais locais e efeitos sistêmicos. Este projeto avaliaria o potencial imunoadjuvante de nanopartículas de quitosana (NPQ) associadas à peçonha de B. leucurus (Bl) para produção de soros antiofídicos. Mas, devido a pendências documentais para autorização da CEUA, a imunização in vivo não foi realizada no período. Assim, foram conduzidas a síntese, caracterização físico-química e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana in vitro. As NPQs foram obtidas por gelificação iônica e caracterizadas quanto ao tamanho, PDI, potencial zeta (PZ) e eficiência de incorporação (EI%). A CIM foi determinada frente a Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027). As NPQ apresentaram 121,0 ± 7,84 nm, PDI de 0,415 ± 0,0035 e PZ de +20,7 ± 0,40 mV. As formulações NPQ-Bl 5% e NPQ-Bl 10% apresentaram 96,80 ± 2,14 e 91,53 ± 1,09 nm, PDI de 0,423 ± 0,046 e 0,405 ± 0,010, PZ de +24,8 ± 0,40 e +20,0 ± 0,83 mV e EI% de 93,2% e 80,6%, respectivamente. A Bl apresentou CIM > 35,7 µg/mL, enquanto NPQ apresentou CIM de 44,6 µg/mL e NPQ-Bl 5% e 10%, 22,3 µg/mL. Os resultados demonstram a obtenção das NPQs e sua capacidade de carrear a Bl, viabilizando o sistema para as posteriores etapas de imunização.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana;Bothrops leucurus;Nanopartículas de quitosana

TITLE: Evaluation of the immunoadjuvant potential of chitosan nanoparticles associated with Bothrops leucurus venom

Abstract

The snake Bothrops leucurus is one of the main species responsible for snakebites in Northeastern Brazil, causing severe local tissue damage and

systemic effects. This project aimed to evaluate the immunoadjuvant potential of chitosan nanoparticles (NPQ) associated with B. leucurus venom (Bl) for antivenom production. However, due to pending documentation for CEUA approval, in vivo immunization was not performed during this period. Thus, the preparation, physicochemical characterization, and preliminary in vitro antimicrobial activity evaluation were conducted. NPQs were prepared by ionic gelation and characterized for size, PDI, zeta potential (ZP), and incorporation efficiency (EI%). The MIC was determined against Staphylococcus aureus (ATCC 25923) and Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027). Unloaded NPQ presented 121.0 ± 7.84 nm, PDI of 0.415 ± 0.0035, and ZP of +20.7 ± 0.40 mV. Formulations NPQ-Bl 5% and NPQ-Bl 10% showed 96.80 ± 2.14 and 91.53 ± 1.09 nm, PDI of 0.423 ± 0.046 and 0.405 ± 0.010, ZP of +24.8 ± 0.40 and +20.0 ± 0.83 mV, and EI% of 93.2% and 80.6%, respectively. Isolated Bl exhibited MIC > 35.7 µg/mL, whereas NPQ showed an MIC of 44.6 µg/mL, and NPQ-Bl 5% and 10% presented 22.3 µg/mL. The results demonstrate the preparation of NPQs and their capacity to carry Bl venom, validating the nanosystem for subsequent immunization stages.

Keywords: Antimicrobial activity; Bothrops leucurus; Chitosan nanoparticles.

Introdução

A *Bothrops leucurus*, conhecida como jararaca-de-cauda-branca, é a principal responsável por envenenamentos ofídicos na região Nordeste do Brasil (Da Silva et al., 2022). A despeito de sua expressiva relevância epidemiológica, a peçonha dessa espécie não integra o *pool* proteico empregado na produção do soro antiofídico polivalente distribuído no país (Da Silva et al., 2022). As toxinas botrópicas provocam intensa reação inflamatória local, edema, dor, hemorragia e miotoxicidade, além de complicações sistêmicas como insuficiência renal e coagulopatias (Da Silva et al., 2022).

Para otimizar a resposta imune na produção de imunoglobulinas antiofídicas e minimizar os efeitos tóxicos locais causados pela administração de peçonhas brutas em animais hiperimunizados, o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de antígenos e imunoadjuvantes é fundamental (Rocha Soares et al., 2012, 2018). Nesse cenário, a quitosana — um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina — destaca-se devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e propriedades imunostimulatórias intrínsecas (Gan e Wang, 2007; Rocha Soares et al., 2017).

Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa demonstraram com êxito que nanopartículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio (TPP) atuam de forma eficaz como carreadores e imunoadjuvantes para peçonhas de escorpiões (*Tityus serrulatus*) e serpentes (*Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*), promovendo uma liberação controlada do antígeno e induzindo elevados títulos de anticorpos neutralizantes com reduzida nocividade local (Rocha Soares et al., 2012, 2017, 2018).

Em razão de atrasos na liberação das licenças éticas necessárias para os ensaios de imunização in vivo previstos na proposta original, o foco das atividades deste período concentrou-se na padronização da obtenção, caracterização físico-química do nanossistema contendo a peçonha de *B. leucurus* (PBI) e na avaliação preliminar de sua atividade antimicrobiana.

Metodologia

Obtenção da peçonha

A peçonha foi cedida pela Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna (UEPB, autorização SisBio nº 64076-1 e SisGen nº ABB2A47). A quantificação de proteína da peçonha foi realizada via método de Bradford (Bradford, 1976).

Síntese das Nanopartículas Poliméricas

Para a produção das NPQs, inicialmente foram obtidas as soluções de quitosana a 0,1% (m/v) solubilizada em ácido acético 0,175% (v/v) (pH = 4,0) e a solução de tripolifosfato de sódio polianiônico (TPP) a 0,1% (m/v) em água destilada (pH = 9,0) (Gan e Wang, 2007; Rocha Soares et al., 2012, 2017, 2018). Em seguida, foi aplicado o método de gelificação iônica, em que a solução de TPP (2 mL) foi gotejada sobre a solução de quitosana (5 mL), a qual permaneceu sob agitação de 300 rpm por 30 minutos, contados após o termino do gotejamento, obtendo-se uma dispersão opalescente (Gan e Wang, 2007).

Para a incorporação da PBI às nanopartículas, as concentrações da peçonha foram calculadas com base na massa de quitosana utilizada. Foram estabelecidas concentrações de 5% e 10%, correspondentes a 250 µg e 500 µg de peçonha, respectivamente. A partir de uma solução estoque de PBI na concentração de 1 mg/mL, foram adicionados 250 µL ou 500 µL à solução de quitosana, de acordo com a concentração desejada. Em seguida, as nanopartículas foram preparadas pelo método de gelificação iônica, conforme descrito anteriormente.

Caracterização Físico-Química

A caracterização físico-química das nanopartículas foi analisada através do método do espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering - DLS) no equipamento Malvern Zetasiver Nano ZS (Malvern Ins. Ltd, Reino Unido), sob ângulo de detecção de 173° e comprimento de onda de 633 nm para avaliação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. As amostras foram lidas em triplicata, a 25°C, e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Para a determinação da Eficiência de Incorporação (EI%), as suspensões de nanopartículas foram centrifugadas, e a quantidade de proteína livre (não incorporada) presente no sobrenadante foi quantificada pelo método de Bradford. A EI% foi calculada pela equação da figura chamada "Cálculo de Eficiência de Incorporação".

Avaliação da Atividade Antimicrobiana (In vitro)

Obtenção do inóculo

A padronização do inóculo dos microrganismos (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)) foi executada seguindo a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2026). Os microrganismos foram cultivados em ágar Brain Heart Infusion (BHI, BD®, EUA) durante 24 h. Posteriormente, uma suspensão microbiana foi obtida em solução salina estéril 0,9%, correspondente a 1x108 UFC/mL de acordo com escala 0,5 de McFarland. Em seguida, esta suspensão foi diluída na proporção de 1:100 (v/v) em caldo Muller Hinton (MH, BD®, EUA), correspondente a 1x106 UFC/mL utilizada para avaliação da atividade antibacteriana.

Determinação da Concentração Inibitória

A concentração inibitória mínima (CIM) das cepas ATCC foram determinadas de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2026), com modificações. Em uma placa de 96 poços, 50 µL da suspensão de microrganismos a 1x106 UFC/mL em caldo MH, foram adicionados a 50 µL das amostras (BI 10%, NPQ, NPQ-BI 5% e NPQ-BI 10%) que foram diluídas previamente em diferentes concentrações (1/1; 1/2; 1/4; 1/8) em caldo MH, para uma concentração final de 5x 105 UFC/mL/poço com posterior incubação a 35+2ºC por 24 h, sob agitação a 200 rpm, sendo avaliada a densidade óptica a 595 nm em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, Estados Unidos da América). Os poços contendo caldo MH foram utilizados como controle de esterilidade do meio (controle negativo de crescimento). Os poços com a suspensão de microrganismo e caldo MH foram utilizados como controle positivo de crescimento.

A CIM foi determinada como a mínima concentração de cada amostra que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano (em que a absorbância a 595 nm foi a mesma do controle negativo de crescimento). Cada amostra foi realizada em triplicata e cada experimento foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram expressos em µg/mL de peçonha livre e µg/mL de quitosana para as NPQs.

Resultados e Discussões

Caracterização Físico-Química e Eficiência de Incorporação

A caracterização por DLS confirmou a formação de sistemas nanométricos para todas as formulações (Tabela 1). A NPQ apresentou tamanho médio de 121,0 ± 7,84 nm. Com a adição da peçonha de B. leucurus, observou-se uma redução no diâmetro médio para 96,80 ± 2,14 nm (NPQ-Bl 5%) e 91,53 ± 1,09 nm (NPQ-Bl 10%). Embora a redução de tamanho possa sugerir uma hipótese de maior compactação e reticulação da matriz polimérica devido a interações eletrostáticas entre os grupos amina da quitosana e os componentes aniônicos da peçonha (Rocha Soares et al., 2017), tal comportamento deve ser interpretado como uma possibilidade estrutural que necessita de confirmações espectroscópicas adicionais.

Os valores do Índice de Polidispersão (PDI) situaram-se próximos de 0,40 (0,415 ± 0,0035 para NPQ; 0,423 ± 0,046 para NPQ-Bl 5%; e 0,405 ± 0,010 para NPQ-Bl 10%). Tais valores indicam que a incorporação da peçonha não provocou alterações significativas na distribuição de tamanho do nanossistema, mantendo o perfil polidisperso característico de nanopartículas de quitosana produzidas por gelificação iônica sem etapas adicionais de filtração ou purificação por tamanho (Gan e Wang, 2007; Rocha Soares et al., 2018).

O potencial zeta permaneceu positivo em todas as formulações (+20,7 ± 0,40 mV para NPQ; +24,8 ± 0,40 mV para NPQ-Bl 5%; +20,0 ± 0,83 mV para NPQ-Bl 10%). A presença de carga superficial positiva, derivada dos grupos amina protonados da quitosana, é um fator que pode contribuir para a estabilidade coloidal do sistema por repulsão eletrostática, embora a confirmação rigorosa da estabilidade dependa de acompanhamento temporal de prateleira (Rocha Soares et al., 2012).

A Eficiência de Incorporação (EI%) atingiu 93,2% na NPQ-Bl 5% e 80,6% na NPQ-Bl 10%. A redução na eficiência de incorporação observada na formulação com 10% de peçonha sugere uma saturação parcial dos sítios de ligação da matriz polimérica frente ao aumento da carga proteica adicionada, dado relevante para a seleção da razão ideal a ser empregada nos ensaios de imunização *in vivo*. Os resultados de caracterização físico-química e eficiência de incorporação se encontram na tabela 1.

Atividade Antimicrobiana (In Vitro)

Nos ensaios de microdiluição, a nanopartícula de quitosana branca (NPQ) apresentou valor de CIM de 44,6 µg/mL (expressa em concentração de quitosana) para as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027), resultado que corrobora com a ação antimicrobiana intrínseca descrita para o polímero de quitosana, cuja carga positiva interage e desorganiza as membranas bacterianas (Gan e Wang, 2007).

A peçonha de *B. leucurus* isolada não apresentou inibição do crescimento microbiano nas maiores concentrações testadas (CIM > 35,7 µg/mL de peçonha). As nanopartículas incorporadas com peçonha (NPQ-Bl 5% e NPQ-Bl 10%) apresentaram CIM de 22,3 µg/mL (expressa em concentração de quitosana). Nas condições testadas, as nanopartículas contendo peçonha apresentaram menor CIM em comparação às nanopartículas brancas.

Contudo, como a própria nanopartícula de quitosana sem peçonha exibiu atividade inibidora considerável, não é possível atribuir esse resultado a uma potencialização direta da atividade das biomoléculas da peçonha, necessitando-se de investigações mecanísticas posteriores para esclarecer o comportamento observacional. Os resultados da atividade antimicrobiana se encontram na tabela 2.

Conclusão

As nanopartículas de quitosana contendo peçonha de *Bothrops leucurus* (NPQ-Bl 5% e NPQ-Bl 10%) pelo método de gelificação iônica foram obtidas. A caracterização físico-química por DLS e a quantificação por Bradford demonstraram a formação de sistemas nanométricos com expressiva eficiência de incorporação proteica (até 93,2%). Nos ensaios microbiológicos preliminares, as nanopartículas contendo peçonha apresentaram valores de CIM inferiores aos das nanopartículas brancas. Como os experimentos em modelo animal não foram iniciados durante este período, a avaliação do potencial imunoadjuvante do nanossistema permanece em aberto e constituirá o foco principal das atividades futuras após a liberação das autorizações éticas.

Referências

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 36. ed. Wayne, PA: CLSI, 2026. Disponível em: clsi.org. Acesso em: 30 ago. 2026.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 59, n. 1, p. 24–34, 2007.

ROCHA SOARES, K. S. et al. Antivenom production against Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas snake venoms using cross-linked chitosan nanoparticles as an immunoadjuvant. Toxins, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2018.

ROCHA SOARES, K. S. et al. Self-assembled scorpion venom proteins cross-linked chitosan nanoparticles for use in the immunotherapy. Journal of Molecular Liquids, v. 241, p. 540–548, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.071>.

ROCHA SOARES, K. S. et al. Serum production against Tityus serrulatus scorpion venom using cross-linked chitosan nanoparticles as immunoadjuvant. Toxicon, v. 60, n. 8, p. 1349–1354, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.010>.

FERNANDES PEDROSA, M. D. F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. D. L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W.; RAMOS, C. R. R.; LEE HO, P.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from Loxosceles laeta venom. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 298, n. 5, p. 638–645, 2002.

DA SILVA, D. P; FERREIRA, S. S; TORRES-RÊGO, M; FURTADO, A. A; YAMASHITA, F. O; DINIZ, E. A. S; VIEIRA, D. S; URURAHY, M. A. G; SILVA-JÚNIOR, A.A; LUNA, K. P. O; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Antiophidic potential of chlorogenic acid and rosmarinic acid against Bothrops leucurus snake venom. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 148, p. 112766, 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248–254, 1976.

Anexos



Cálculo de Eficiência de Incorporação



Tabela 1 – Propriedades físico-químicas e eficiência de incorporação de nanopartículas de quitosana incorporadas com a peçonha de Bothrops leucurus.



Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima das nanopartículas vazias e incorporadas com a peçonha B. leucurus para cepas de S. aureus ATCC 25923 e de P. aeruginosa ATCC 9027.

CÓDIGO: SB1399

AUTOR: ISAAC CESAR AZEVEDO DE LIRA NASCIMENTO

ORIENTADOR: RENATA GONCALVES FERREIRA

TÍTULO: Estresse e estabilidade do perfil comportamental de macacos-prego resgatados do cativeiro ilegal

Resumo

Este trabalho analisou a estabilidade do perfil comportamental de macacos-prego (Sapajus spp.) cativos no CETAS/IBAMA em Natal/RN e sua relação com o estresse. A partir de registros de 2016 a 2024, realizou-se uma análise preliminar com 20 indivíduos (adultos e juvenis) em três trimestres consecutivos. Os comportamentos foram classificados em normativos da espécie (CNG) e indicativos de estresse (CPIE). A Análise de Componentes Principais (PCA) identificou cinco dimensões exploratórias (42,7% da variância). A repetibilidade (ICC) mostrou maior consistência em adultos (ICC até 0,82) do que em juvenis (apenas uma dimensão significativa com ICC = 0,40), indicando que a estabilidade do perfil aumenta com o desenvolvimento. A análise combinada de sexo e idade revelou padrões não uniformes, destacando alta repetibilidade em machos adultos (ICC até 0,87). A relação com os CPIE permanece em fase de conclusão. Os resultados reforçam a influência da ontogenia na consolidação da personalidade animal, apontando maior flexibilidade comportamental na imaturidade.

Palavras-chave: Estabilidade comportamental; Personalidade animal; Ontogenia; CETAS.

TITLE: Analysis of Behavioral Profile Stability and Its Relationship with Stress in Captive Capuchin Monkeys (Sapajus spp.)

Abstract

This study analyzed behavioral profile stability in captive capuchin monkeys (Sapajus spp.) at CETAS/IBAMA (Natal, Brazil) and its relation to stress. Based on 2016–2024 records, a preliminary analysis of 20 individuals (adults and juveniles) over three consecutive quarters was conducted. Behaviors were categorized into gender-normative and potentially stress-indicative. Principal Component Analysis (PCA) identified five exploratory dimensions (42.7% of variance). Repeatability (ICC) revealed higher consistency in adults (ICC up to 0.82) than in juveniles (only one significant dimension, ICC = 0.40), indicating that behavioral stability increases with development. Combined sex-age analysis showed non-uniform patterns, with high repeatability in adult males

(ICC up to 0.87). Stress-behavior analysis is pending. Results highlight ontogeny's role in personality consolidation, suggesting greater behavioral flexibility in early life.

Keywords: Behavioral stability; Animal personality; Ontogeny; CETAS.

Introdução

Os macacos-prego do gênero Sapajus são primatas neotropicais conhecidos pela capacidade de aprendizagem, uso de ferramentas e complexidade das relações sociais (Fragaszy et al., 2004). Além de sua importância ecológica, são relevantes para estudos sobre comportamento e cognição. No Brasil, muitos indivíduos são encaminhados aos Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) após resgates, apreensões ou situações de cativeiro ilegal (Levacov et al., 2011). Na região Nordeste, o gênero está presente nos nove centros de triagem e reabilitação, reforçando sua importância para o manejo e a conservação da fauna silvestre (Damasceno, 2022). Em animais destinados à reabilitação e possível retorno à natureza, a avaliação não deve considerar apenas a condição física. O comportamento também pode indicar como os indivíduos respondem às diferentes situações. Nesse contexto, a personalidade animal corresponde a diferenças comportamentais individuais que tendem a se manter ao longo do tempo e em diferentes situações (Réale et al., 2007), apresentando traçoscomo sociabilidade, agressividade, atividade e dominância (Gosling, 2001; Freeman & Gosling, 2010). Estudos com macacos-prego já identificaram traços de personalidade relativamente consistentes, tanto em cativeiro quanto na natureza (Morton et al., 2013; Uher et al., 2013; Ferreira et al., 2016). Entretanto, essa estabilidade pode variar durante o desenvolvimento. Em indivíduos selvagens, foi observada grande variação comportamental nos primeiros anos de vida (Delval et al., 2020), enquanto Omena et al. (2023) ao analisarem o eixo de sociabilidade viram que, apesar de haver baixa estabilidade dos comportamentos, fêmeas imaturas eram mais sociáveis que machos imaturos. As condições de cativeiro podem influenciar o comportamento. Quando as necessidades ambientais, sociais e de manejo não são atendidas, podem surgir comportamentos repetitivos ou atípicos (Hosey, 2005; Clubb & Mason, 2007). Em macacos-prego, comportamentos relacionados ao estresse podem representar parte importante do repertório de indivíduos cativos, sendo menos frequentes em animais selvagens ou reintroduzidos (Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2016; Verderane, 2010). Além disso, o modelo da diversidade comportamental considera que indivíduos em melhores condições podem apresentar maior diversidade de comportamentos, enquanto indivíduos com alterações no bem-estar podem apresentar um repertório menos diverso. (Miller et al., 2020). Nesse contexto, avaliar a diversidade do repertório e, separadamente, a estabilidade dos comportamentos ao longo do tempo pode contribuir para a compreensão das diferenças individuais e fornecer informações relevantes para o manejo de animais em reabilitação. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar a estabilidade do perfil comportamental de macacos-prego (Sapajus spp.) cativos e sua relação com comportamentos indicativos de estresse. Especificamente, buscou-se: caracterizar os eixos do perfil comportamental; verificar diferenças relacionadas ao sexo e à idade ao longo dos trimestres; Um dos objetivos iniciais do estudo também foi avaliar a relação entre comportamentos potencialmente indicativos de estresse e a estabilidade dos perfis comportamentais. No entanto, essa análise ainda não foi realizada até o momento, permanecendo como uma etapa a ser desenvolvida com a ampliação e conclusão das análises da base de dados. Foram testadas três hipóteses:indivíduos imaturos

apresentariam menor estabilidade comportamental que adultos; fêmeas apresentariam estabilização mais precoce e maior repetibilidade durante o período imaturo;

Metodologia

O estudo foi desenvolvido a partir de registros comportamentais de macacos-prego (Sapajus spp.) mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), em Natal, Rio Grande do Norte. Foram utilizados registros produzidos entre 2016 e 2024, armazenados no banco de dados do CO-Lab. Os dados foram obtidos no âmbito de diferentes projetos previamente autorizados pelos órgãos responsáveis. Como os animais eram provenientes principalmente de apreensões ou entregas voluntárias, a classificação etária foi, portanto, estabelecida a partir de características morfológicas,como coloração da pelagem e da face, conformação corporal e facial e presença de marcas naturais ou adquiridas, e medidas corporais registradas nas fichas de processamento dos primatas. Foram consideradas as categorias de infante, juvenil I, juvenil II, juvenil III, subadulto e adulto. Além disso, os animais foram identificados como Sapajus libidinosus com base em características morfológicas. Entretanto, como a origem de parte dos indivíduos é desconhecida, não é possível descartar completamente a ocorrência de possíveis híbridos. Durante o período de permanência no CETAS, os animais eram mantidos em sete recintos, com dimensões entre 5 × 2 × 2,80 m e 5 × 4 × 2,80 m. Todos os recintos apresentavam recursos de enriquecimento ambiental. A alimentação era composta por frutas, legumes, verduras, ovos, ração e sementes, além da disponibilidade água ad libitum. O banco de dados reunia inicialmente 122 indivíduos, sendo 66 machos e 56 fêmeas. Desse total, 88 eram classificados como adultos e 34 como imaturos. critérios foram definidos para reduzir possíveis diferenças no esforço amostral entre os indivíduos. Dessa forma, o número final de animais utilizado nas análises foi inferior ao número inicialmente disponível na base Organização e tratamento da base de dados Entre setembro de 2025 e março de 2026, foi realizada a organização e padronização da base de dados comportamentais utilizada no estudo. Foram revisados e padronizados os registros, incluindo a nomenclatura dos comportamentos, a organização das observações por indivíduo e trimestre e a conferência das datas e da sequência dos períodos de observação. Também foram identificados dados faltantes, inconsistências e registros que necessitavam de verificação. Essa etapa permitiu definir quais indivíduos apresentavam períodos consecutivos de observação suficientes para as análises e preparar a base para as etapas estatísticas posteriores. Registro e organização dos comportamentos O repertório comportamental utilizado no estudo foi estruturado a partir do etograma de Ferreira et al. (2016)(Quadro 1). Os comportamentos foram classificados em duas categorias principais: comportamentos normativos de gênero (CNG) e comportamentos potencialmente indicativos de estresse (CPIE). Esse estudo vai permitir trabalhar separadamente com comportamentos considerados esperados para a espécie e aqueles que poderiam estar relacionados a alterações no bem-estar dos animais.O etograma completo está em anexo com a descrição do comportamento (Quadro 1) Quando necessário, comportamentos semelhantes ou pouco frequentes foram agrupados para reduzir a ocorrência de valores nulos e facilitar a utilização dos dados nas análises multivariadas. Análise estatística Entre março e julho de 2026 realizamos análises estatísticas s no software R. Inicialmente, foram calculadas as taxas de ocorrência dos comportamentos para cada indivíduo e período de observação. As dimensões

comportamentais foram investigadas por meio de Análise de Componentes Principais (PCA)(obj específico 1), utilizada para identificar padrões de associação entre os comportamentos registrados e reduzir o conjunto de variáveis a eixos que representassem diferentes dimensões do perfil comportamental. Os escores individuais obtidos nesses eixos foram utilizados para avaliar a estabilidade dos perfis entre os trimestres, estimada por meio do coeficiente de correlação intraclasse (ICC). A repetibilidade (obj específico 3) foi estimada a partir dos registros de três períodos consecutivos. Para a interpretação dos ICCs, foram considerados valores inferiores a 0,50 como baixa repetibilidade, valores entre 0,50 e 0,75 como repetibilidade moderada e valores superiores a 0,75 como alta repetibilidade, conforme Koo e Li (2016). Modelos lineares mistos foram utilizados inicialmente considerando a classe etária dos indivíduos. Também foram feitas análises exploratórias considerando conjuntamente sexo e idade, permitindo verificar possíveis diferenças na estabilidade comportamental entre machos e fêmeas em diferentes fases do desenvolvimento (prediçoes 1 e 2). A predição 3 refere-se a avaliação da ocorrência de comportamentos potencialmente indicativos de estresse considerando tanto sua quantidade quanto sua diversidade. A diversidade comportamental será estimada pelo índice de Shannon. Essa análise, entretanto, ainda não foi concluída. . Esses dados serão utilizados para verificar se a frequência e a diversidade dos CPIE estão relacionadas à estabilidade dos perfis comportamentais.

Resultados e Discussões

Estrutura das dimensões comportamentais As análises preliminares foram realizadas com uma amostra de 20 indivíduos, distribuídos igualmente entre machos adultos, fêmeas adultas, machos juvenis e fêmeas juvenis. Para cada animal, foram utilizados três trimestres consecutivos de observação, totalizando 60 observações comportamentais. Inicialmente, foram consideradas 53 variáveis comportamentais. Após a retirada das variáveis sem variação, permaneceram 46 comportamentos para a análise de componentes principais. O teste de esfericidade de Bartlett apresentou resultado significativo ($\chi^2 = 2247{,}98$; $p < 0{,}001$), indicando associação entre as variáveis suficiente para a realização da análise multivariada. Entretanto, o índice KMO apresentou valor baixo (MSA = 0,31), indicando que a estrutura de correlação encontrada ainda apresenta limitações. A partir do scree plot, foram selecionadas cinco dimensões comportamentais. A primeira explicou 19,5% da variância total, enquanto as dimensões seguintes explicaram 7,1%, 6,1%, 5,3% e 4,7%, respectivamente. Em conjunto, as cinco dimensões responderam por aproximadamente 42,7% da variação observada. Apesar da identificação dessas dimensões, houve baixa concentração da variância nas primeiras componentes, não sendo observada, nessa etapa, uma estrutura suficientemente definida para que os eixos fossem interpretados como construtos consolidados de personalidade por isso serão chamados pelo numero de ordem.. Esse resultado é importante porque indica que a organização do repertório comportamental ainda não pode ser considerada definitiva. A limitação encontrada pode estar relacionada ao tamanho reduzido da amostra e à diversidade do repertório comportamental dos macacos-prego. Além disso, a PCA utilizou mais de uma observação por indivíduo, o que pode influenciar as associações entre as variáveis devido à presença de medidas repetidas. Dessa forma, os cinco eixos identificados devem ser considerados dimensões comportamentais exploratórias, e não necessariamente dimensões definitivas de personalidade. A análise da base ampliada

será importante para verificar se essa estrutura se mantém após a aplicação integral dos critérios de inclusão estabelecidos para o estudo. (Gráfico 1) Estabilidade comportamental ao longo do desenvolvimento A análise de repetibilidade(Gráfico 2) revelou diferenças entre adultos e juvenis. Considerando apenas a classe etária, os adultos apresentaram repetibilidade moderada ou alta em três das cinco dimensões avaliadas: dimensão 2 (ICC = 0,54; p = 0,003), dimensão 3 (ICC = 0,82; p < 0,001) e dimensão 4 (ICC = 0,56; p = 0,001). Na dimensão 3, o ICC de 0,82 indica uma elevada consistência dos escores individuais entre os períodos analisados. Entre os juvenis, apenas a dimensão 4 apresentouICC = 0,40 (p = 0,015), enquanto as demais dimensões apresentaram valores inferiores. Assim, mesmo considerando que o valor de 0,40 esteja abaixo do limite definido para repetibilidade moderada, o resultado foi estatisticamente significativo. A diferença observada entre as classes etárias aponta para uma tendência de maior consistência comportamental nos adultos e maior variação intraindividual nos juvenis.Esse padrão é compatível com os estudos de Delval et al.2020., que apontam menor estabilidade dos perfis comportamentais em indivíduos juvenis, e com estudos que indicam maior estabilidade desses perfis em macacos-prego adultos, reforçando a possibilidade de mudanças na consistência comportamental ao longo do desenvolvimento. Nesse sentido, os resultados preliminares reforçam a possibilidade de que a ontogenia tenha papel importante na estabilidade dos comportamentos individuais. Durante as fases iniciais do desenvolvimento, mudanças relacionadas à maturação e às experiências sociais podem contribuir para uma maior flexibilidade comportamental, enquanto indivíduos adultos podem apresentar padrões. Entretanto, essa interpretação ainda deve ser feita com cautela. A análise utilizada até o momento possui amostra reduzida e ainda não contempla a aplicação completa dos critérios de exclusão estabelecidos para a base geral. Portanto, a tendência observada não deve ser considerada uma evidência definitiva de maior estabilidade em adultos. Diferenças entre machos e fêmeas Quando sexo e classe etária foram considerados conjuntamente, foram observadas diferenças na distribuição da repetibilidade entre os grupos. Entre os machos adultos, foram identificadas altas taxas de repetibilidade nas dimensões 2 (ICC = 0,75; p = 0,003) e 3 (ICC = 0,87; p < 0,001). Entre as fêmeas adultas, foram observadas repetibilidades moderadas nas dimensões 1 (ICC = 0,55; p = 0,026), 3 (ICC = 0,53; p = 0,016) e 4 (ICC = 0,65; p = 0,003). Nos juvenis, os machos apresentaram alta repetibilidade na dimensão 4 (ICC = 0,77; p < 0,001), enquanto as fêmeas apresentaram repetibilidade moderada nas dimensões 2 (ICC = 0,59; p = 0,021) e 5 (ICC = 0,51; p = 0,043).(Grafico 3) Esses resultados demonstram que a estabilidade não ocorreu de maneira uniforme entre os grupos. Algumas dimensões apresentaram consistência em determinado sexo ou faixa etária, enquanto outras não apresentaram repetibilidade significativa. Isso sugere que a estabilidade comportamental pode estar associada não apenas à idade, mas também ao sexo do individuo e às características específicas de cada dimensão comportamental. No entanto, os dados disponíveis ainda não permitem afirmar que exista um padrão geral de maior estabilidade em machos ou fêmeas. A análise preliminar mostra diferenças entre os grupos, mas o tamanho reduzido da amostra limita comparações mais abrangentes. Assim, os resultados devem ser utilizados principalmente para orientar a análise da base completa. Relação entre estabilidade comportamental e comportamentos potencialmente indicativos de estresse A hipótese proposta prevê que indivíduos que apresentam maior quantidade e diversidade de CPIE apresentariam menor estabilidade nas dimensões comportamentais baseadas nos CNG. Entretanto, as análises relativas a essa predição ainda não foram realizadas, pois a parte da organização do banco de dados consumiu mais tempo que o

previsto. Portanto, não é possível estabelecer, neste momento, uma relação estatística entre a ocorrência dos CPIE e a estabilidade comportamental.

Conclusão

Os resultados preliminares indicam uma tendência de maior estabilidade comportamental nos macacos-prego adultos em comparação aos juvenis, especialmente em algumas das dimensões identificadas pela análise exploratória. Esse padrão é compatível com a hipótese de que os perfis comportamentais apresentam maior consistência à medida que os indivíduos avançam no desenvolvimento. Apesar disso, a estrutura das dimensões comportamentais e as diferenças entre os grupos ainda não podem ser consideradas definitivas, devido ao tamanho reduzido da amostra e ao caráter preliminar das análises. A continuidade do estudo, com a organização completa do banco de dados, será necessária para confirmar essas tendências e avaliar a relação entre estabilidade comportamental e CPIE

Referências

Clubb, R., & Mason, G. J. (2007). Natural behavioural biology as a risk factor in carnivore welfare: How analysing species differences could help zoos improve enclosures. Applied Animal Behaviour Science, 102, 303–328. doi:10.1016/j.applanim.2006.05.033 Damasceno, T. M. M. (2022). Primatas não-humanos recebidos em centros de triagem no Nordeste entre 2019 e 2022 (Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Norte). Repositório Institucional da UFRN. Recuperado de https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/51347 Delval, I., Fernández-Bolaños, M., & Izar, P. (2020). A longitudinal assessment of behavioral development in wild capuchins: Personality is not established in the first 3 years. American Journal of Primatology, 82(11), e23116. doi:10.1002/ajp.23116 Fragaszy, D. M., Visalberghi, E., & Fedigan, L. M. (2004). The complete capuchin: The biology of the genus Cebus. Cambridge, England: Cambridge University Press. Ferreira, R. G., Mendl, M., Wagner, P. G. C., Araujo, T., Nunes, D., & Mafra, A. L. (2016). Coping strategies in captive capuchin monkeys (Sapajus spp.). Applied Animal Behaviour Science, 176, 120–127. doi:10.1016/j.applanim.2015.12.007 Freeman, H. D., & Gosling, S. D. (2010). Personality in nonhuman primates: A review and evaluation of past research. American Journal of Primatology, 72(8), 653–671. doi:10.1002/ajp.20833 Gosling, S. D. (2001). From mice to men: What can we learn about personality from animal research? Psychological Bulletin, 127(1), 45–86. doi:10.1037/0033-2909.127.1.45 Hosey, G. R. (2005). How does the zoo environment affect the behaviour of captive primates? Applied Animal Behaviour Science, 90(2), 107–129. doi:10.1016/j.applanim.2004.08.015 Koo, T. K., & Li, M. Y. (2016). A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. Journal of Chiropractic Medicine, 15(2), 155–163. doi:10.1016/j.jcm.2016.02.012 Levacov, D., Jerusalinsky, L., & Fialho, M. S. (2011). Levantamento dos primatas recebidos em centros de triagem e sua relação com o tráfico de animais silvestres no Brasil. In F. R. Melo & Í. M. C. Mourthé (Eds.), A primatologia no Brasil (Vol. 11, pp. 281–305). Belo Horizonte, Brasil: Sociedade Brasileira de Primatologia. doi:10.13140/2.1.3425.1200

Miller, L. J., Vicino, G. A., Sheftel, J., & Lauderdale, L. K. (2020). Behavioral diversity as a potential indicator of positive animal welfare. Animals, 10(7), 1211. doi:10.3390/ani10071211 Morton, F. B., Lee, P. C., & Buchanan-Smith, H. M. (2013). Taking personality selection bias seriously in animal cognition research: A case study in capuchin monkeys (Sapajus apella). Animal Cognition, 16(4), 677–684. doi:10.1007/s10071-013-0603-5 Morton, F. B., Lee, P. C., Buchanan-Smith, H. M., Brosnan, S. F., Thierry, B., Paukner, A., ... Weiss, A. (2013). Personality structure in capuchin monkeys (Sapajus apella): Comparisons with chimpanzees (Pan troglodytes), orangutans (Pongo spp.), and rhesus macaques (Macaca mulatta). Journal of Comparative Psychology, 127(3), 282–298. doi:10.1037/a0031723 Omena, J., & Izar, P. (2023). Ontogeny of sociability of wild immature capuchin monkeys (Sapajus libidinosus): Sex, more than personality, explains interindividual variation. American Journal of Primatology, 85(10), e23533. doi:10.1002/ajp.23533 Réale, D., Reader, S. M., Sol, D., McDougall, P. T., & Dingemanse, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. Biological Reviews, 82(2), 291–318. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x Uher, J., Addessi, E., & Visalberghi, E. (2013). Contextualised behavioural measurements of personality differences obtained in behavioural tests and social observations in adult capuchin monkeys (Cebus apella). Journal of Research in Personality, 47(4), 427–444. doi:10.1016/j.jrp.2013.01.013 VERDERANE, Michele Pereira. Socioecologia de macacos-prego (cebus libidinosus) em área de ecótono cerrado/caatinga. 2010. Tese (Doutorado em Psicologia Experimental) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/T.47.2010.tde-27072010-084124. Acesso em: 2026-08-30.

Anexos



Gráfico 1. Scree plot da análise de componentes principais (PCA), indicando a porcentagem de variância explicada por cada dimensão.



Gráfico 2: Repetibilidade comportamental (ICC) das cinco dimensões do perfil comportamental, separadas por grupo etário (adultos e juvenis). As barras representam os valores de ICC e as linhas verticais indicam o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A



Gráfico 3: Repetibilidade comportamental (ICC) das cinco dimensões do perfil comportamental, separadas por grupo etário (adultos e juvenis) e sexo. As barras

representam os valores de ICC e as linhas verticais indicam o intervalo de confiança de 95% (IC 9



Etograma composto por comportamentos e descrições baseados em Ferreira et al. (2016). As células em cinza claro correspondem aos Comportamentos Normativos de Gênero (CNG), enquanto as células em cinza escuro indicam Comportamentos Potencialmente Indicativ



Potencialmente Indicativos de Estresse (CPIE).



Etograma



Etograma



Etograma



Etograma

CÓDIGO: SB1432

AUTOR: SAMARA VANESSA DIAS ALEXANDRE

COAUTOR: LARISSA HENRIQUE PONTES

ORIENTADOR: RENATA ANTONACI GAMA

TÍTULO: Avaliação de dietas artificiais na criação de Chrysomya megacephala em laboratório: uma abordagem em entomologia forense aplicada

Resumo

Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) é uma espécie de díptero necrófago de relevância ecológica, forense e sanitária, que atua na decomposição da matéria orgânica e é frequentemente utilizada em estudos de entomologia forense. A manutenção de colônias em laboratório é fundamental para o desenvolvimento de pesquisas experimentais, promovendo condições adequadas de criação, especialmente relacionadas à oferta de uma dieta que seja capaz de manter sua manutenção, desenvolvimento e sua reprodução. Com foco em avaliar e consequentemente manter um padrão de dieta para criação dessa espécie em um ambiente controlado, escolheu testar um substrato alimentar prático, que não tivesse grandes impactos negativos na vida e ciclo do espécime. Portanto, o sachê de ração úmida comercial para cães foi selecionado e a partir dele foi executada a observação dos parâmetros relacionados à aceitação da dieta, desenvolvimento larval, formação de pupas e emergência de adultos, com foco em dimensionar a viabilidade do alimento como alternativa prática, acessível e padronizável para a manutenção da espécie em laboratório. O trabalho demonstrou que a dieta testada teve potencial para sustentar o ciclo biológico de C. macellaria, mantendo indivíduos em quantidade suficiente para a manutenção da colônia. Assim, o presente estudo fornece subsídios para o estabelecimento de protocolos de criação mais consistentes, favorecendo pesquisas nas áreas de entomologia forense e biologia de dípteros necrófagos.

Palavras-chave: C. macellaria; dípteros necrófagos; dieta artificial; insetário.

TITLE: Maintenance of Necrophagous Dipterans in an Insectary: The Importance of Artificial Diets – Evaluation of Artificial Diets for Rearing Calliphoridae in the Laboratory: An Approach to Applied Forensic

Abstract

Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) is a necrophagous dipteran species of ecological, forensic, and sanitary relevance, contributing to organic matter decomposition and frequently used in forensic entomology studies. Maintaining laboratory colonies is essential for experimental research, requiring appropriate rearing conditions, particularly a diet capable of supporting maintenance, development, and reproduction. This study aimed to evaluate and establish a dietary standard for rearing this species under controlled conditions, using a practical food substrate with minimal negative effects on its life cycle. A commercial wet dog food sachet was therefore selected, and parameters related to diet acceptance, larval development, pupation, and adult emergence were observed to assess its viability as a practical, accessible, and standardized alternative for laboratory colony maintenance. The study demonstrated that the tested diet had the potential to sustain the biological cycle of C. macellaria, maintaining sufficient numbers of individuals for colony maintenance. Thus, this study provides support for establishing more consistent rearing protocols, contributing to research in forensic entomology and the biology of necrophagous dipterans.

Keywords: C. macellaria; necrophagous dipterans; artificial diet; insectary.

Introdução

Os estudos com dípteros necrófagos possuem significativamente relevância ecológica. Esses organismos desempenham funções essenciais nos ecossistemas, contribuindo na decomposição da matéria orgânica, no ciclo de nutrientes e na sucessão entomológica associada à decomposição de cadáveres. (D. M. Vega., 2011). Diversas espécies possuem importância forense pois estão entre as primeiras colonizadoras de corpos em decomposição, auxiliando assim na estimativa do intervalo pós-morte (IPM). (Ivorra et al., 2023) A família Calliphoridae possui elevada importância epidemiológica como vetores mecânicos de microrganismos patogênicos, como bactérias causadoras de diarreia, Salmonella spp. e Shigella spp. para os alimentos (Chaiwong et al., 2012; Chaiwong et al., 2014), além de poderem pousar em diversas superfícies possivelmente contaminadas e terem aderidas na superfície de seu corpo, ou grudadas nas cerdas de suas pernas, bactérias, vírus ou ovos de parasitas. (Silva Junior et al., 1998).Soma-se a isso o fato de esses insetos apresentarem alimentação extracorpórea, na qual o alimento é parcialmente liquefeito pela ação da saliva e de conteúdos regurgitados do aparelho digestório. Esse comportamento, associado à defecação, pode favorecer a disseminação mecânica de microrganismos em diferentes substratos (Stoffolano, 2022). Assim, espécies da família Calliphoridae, incluindo Cochliomyia macellaria, podem representar potenciais carreadoras mecânicas de microrganismos, especialmente em ambientes nos quais há contato entre os insetos, matéria orgânica e diferentes substratos (Olsen, 1998; Maldonado; Centeno, 2003; Stoffolano, 2022). Estudos comportamentais, binômicos e laboratoriais com dípteros frequentemente destacam a necessidade do estabelecimento de uma manutenção de colônias em condições controladas. Esses espécimes em insetário, necessitam dos fatores ambientais, como temperatura e umidade em condições ideais, com espaço e alimentação padronizados, de modo a garantir sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução (Coudron et al., 2025). Diante desse panorama, um dos fatores relevantes para o desenvolvimento e a manutenção de colônias de Cochliomyia macellaria, se trata da dieta, como por exemplo, à base de carne que pode interferir em seu desenvolvimento pós-embrionário em condições laboratoriais (Silva; Milward-de-Azevedo, 1994). Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar o potencial de uma

dieta comercial úmida para manutenção uma colônia de C. macellaria, a fins de estabelecer protocolos de criação mais consistentes, favorecendo pesquisas nas áreas de entomologia forense, ecologia e biologia de dípteros necrófagos.

Metodologia

3.1 Local, organismo experimental e manutenção da colônia O experimento foi realizado no Laboratório de Insetos e Vetores (LIVe) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), o qual possui um insetário com temperatura (~26°C), ciclo claro/escuro (12/12h) e umidade do ar (75-80%) controladas. Dentro desse ambiente controlado foi realizado o experimento no qual se utilizou de uma espécie já estabelecida pertencente à família Calliphoridae, a C. macellaria. O tempo de acompanhamento para coleta dos dados do ciclo do espécime possui duração de cerca de dois meses, desde a geração F8 à F10. O acompanhamento da colônia foi realizado diariamente por meio observacional, acompanhado seu comportamento. A troca periódica de uma solução açucarada embebida no algodão, para a sustentação da vida da espécie também foi realizada. 3.2 Delineamento experimental e dietas Para a realização dos bioensaios, ocorreu a separação de 180 casais de C. macelleria da geração F10, sendo 90 casais para cada dieta, e cada dieta testada em triplicata. A dieta controle era composta por levedo de cerveja em pó, farinha láctea, leite em pó integral e água destilada na proporção de 1:1:1 (Gama et al., 2021), já no grupo tratado foi utilizado o sachê de ração úmida canina da marca Pedigree, no sabor carne e frango ao molho. Sendo disponibilizada metade do sachê para cada gaiola (tratada), no valor de 85g total do conteúdo. (Figura 1). As dietas apresentadas (Figura 1) foram colocadas nas respectivas gaiolas e foram observadas diariamente para avaliação dos parâmetros biológicos e organolépticos. 3.3 Preparação das gaiolas e acompanhamento do desenvolvimento As avaliações foram iniciadas por meio da observação visual das gerações F8 e F9 da colônia de Cochliomyia macellaria, para prévia avaliação da estabilidade da colônia em relação ao número de posturas, duração do ciclo e longevidade dos adultos. Sendo os dados registrados apenas o tempo de duração e os demais apenas uma perspectiva visual para futura avaliação em F10, na qual a partir dessa linhagem foram separadas em triplicata para o grupo apresentado a dieta controle e a dieta comercial (Figura 02(A)). Os insetos foram mantidos em gaiolas de acrílico com 30x30x30 e transferidas para gaiolas menores de arame revestido com 20x20x20, revestido de um voal para contenção dos exemplares (Figura 02 (B)) apenas, para melhor logística de transporte e de espaço. O acompanhamento do ciclo de desenvolvimento foi realizado quantificando o número de indivíduos em cada fase do ciclo, assim como, o tempo entre as fases. O desenvolvimento ontogenético segue a seguinte ordem: ovos, larvas L1, L2, L3, pupas e adultos, marcando também o dia da oviposição de cada gaiola. 3.4 Contagem e avaliação do desenvolvimento dos indivíduos A obtenção dos ovos viáveis foi realizada no dia primeiro da oviposição de cada gaiola e assim retirando a massa de ovos, para serem separados para contagem. Com auxílio de um pouco de água filtrada e um pincel, a massa de ovo foi separada para contagem em uma placa de petri, sobreposta em cima de uma superfície azul que permitisse a contagem por meio do contraste de cor em relação a cor branca amanteigada dos ovos de mosca (Figura 03(A)). Essa contagem foi repetida no primeiro dia de oviposição e no segundo dia de oviposição de cada gaiola para maior segurança dos dados obtidos. Após contagem cuidadosa e individual, eles foram postos de volta para seguimento do ciclo de vida. O acompanhamento das fases larvais foi realizada,

mas a contagem foi feita apenas quando eles alcançaram L3, pois a contagem nas fases anteriores eram inviáveis pelo fato de estarem em grande parte submersas na dieta, em grande massa larval e bastante agitadas para uma verificação fiel ou mesmo aproximada do quantitativo presente (Figura 03(B)). Em seguida, a formação das pupas também foi contada de forma visual e em seguida levada a gaiola respectiva de sua linhagem (F11), para aguardo da emergência dos adultos. A cada fase iniciada, foi feita a contagem e a anotação da data. Os parâmetros avaliados para comparação das dietas foram: número de ovos, desenvolvimento larval, pupação, emergência de adultos e longevidade dos adultos. 3.5 Análise bromatológica e organoléptica das dietas Para uma análise da composição das dietas utilizadas foram executados testes de umidade, cinzas (minerais), proteínas, lipídios, carboidratos e fibras no Laboratório de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e respeitando os protocolos de acordo com a AOAC - Association of Official Analytical Chemists (2005). Além disso, foram observadas diariamente as mudanças de odor e outras características visuais- mudança de cor, consistência e presença de fungos.

Resultados e Discussões

Inicialmente, foi realizado o acompanhamento da colônia de Cochliomyia macellaria antes da instalação do experimento, incluindo as gerações F8 à F10. Na geração F8, os primeiros adultos foram registrados em 06/03/2026, sendo observada a primeira oviposição em 13/03/2026, sete dias após o surgimento dos adultos. A geração F9 foi estabelecida em 18/03/2026, a partir de pupas, e os primeiros ovos provenientes dessa geração foram observados em 31/03/2026. O acompanhamento da colônia seguiu até a geração F10, em que os adultos foram posteriormente separados para o início do experimento no dia 09/04/2026 com 30 pares de C. macellaria em cada uma das seis gaiolas. Os dados referentes ao grupo controle apresentaram um não seguimento do ciclo, em que nas duas oviposições atreladas a gaiola C1 e C3 foram obtidos ovos não viáveis a continuidade da vida. As moscas das gaiolas controles conseguiram ser mantidas vivas com a dieta. Em 24/05/2026, foi realizada a contagem dos adultos remanescentes, totalizando 82 indivíduos, sendo 9 na gaiola C1, 23 na C2 e 50 na C3. No grupo comercial, foram observadas oviposições em todas as gaiolas, com diferenças na quantidade de ovos entre as unidades experimentais. A gaiola T1 apresentou aproximadamente 1.550 ovos na primeira oviposição e 297 ovos na segunda, seguida da identificação de 926 indivíduos no estágio L3, 926 pupas e 891 adultos. Na gaiola T2, foram registrados aproximadamente 120 ovos na primeira oviposição e 1.430 ovos na segunda, com 227 indivíduos em L3, 227 pupas e 177 adultos. Já na gaiola T3, foram observados aproximadamente 660 ovos na primeira oviposição e 300 ovos na segunda, seguidos de 723 indivíduos em L3, 723 pupas e 321 adultos. Dessa forma, diferentemente do grupo controle, as três gaiolas submetidas à dieta comercial apresentaram progressão dos indivíduos ao longo dos estágios de desenvolvimento, desde a oviposição até a formação de adultos (Tabela 01). Se passaram 21 dias do estabelecimento dos adultos de F10 até o inicio dos adultos da geração F11, na qual foi obtido um número de 1.389 adultos, sendo 652 fêmeas e 737 machos, distribuídos entre T1, T2 e T3. (Tabela 02). Assim, possibilitando a sequência do ciclo, em continuidade da vida das moscas em criação de insetário. Portanto, as três gaiolas do grupo comercial apresentaram progressão dos indivíduos entre os estágios de desenvolvimento avaliados, com registro de larvas em L3, pupas e adultos. Perfil bromatológico e

organoléptico das dietas Nas análises bromatológicas foram determinados os teores de proteínas, cinzas, umidade, lipídios e matéria fibrosa, seguindo o protocolo adotado pelo laboratório e os métodos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Os dados referentes à amostra-controle foram obtidos de Santos (2025, p. 30) e os dados referentes à dieta comercial foram obtidos a partir dos experimentos realizados no presente estudo. Ao decorrer do experimento foram realizadas as análises organolépticas, em que foi percebida algumas variações no aspecto, cor e odor, as quais foram acompanhadas desde o primeiro dia em que foram apresentadas aos exemplares, bem como ao decorrer dos dias. Dessa forma, foi possível observar diferenças expressivas nos teores de proteínas, lipídeos e carboidratos entre as dietas (Tabela 03), sendo a dieta comercial a que apresentou maiores teores desses macronutrientes. A maioria das moscas conhecidas como varejeiras, incluindo a C. macellaria, possuem larvas de hábito predominantemente necrófago e dependem de substratos ricos em proteínas e lipídios para atingir o peso necessário à pupação (FERRAZ et al., 2010; GINGRICH et al., 1964). Nos adultos, da família Calliphoridae, os carboidratos são importantes para a sobrevivência, enquanto fontes proteicas participam da maturação ovariana e da produção de ovos (DA SILVA et al., 1999). Na criação de espécies é comum se usar fígado, carne, peixe ou outros tecidos animais, e mesmo esses substratos possuindo a capacidade de proporcionar bom desenvolvimento, apresentam variabilidade nutricional, odor intenso, dificuldade de armazenamento e bem como o maior risco de contaminação microbiológica. Assim, se percebe nas dietas artificiais ou comerciais uma alternativa mais padronizada e segura para a criação, mantendo suas exigências nutricionais de espécies necrófagas, atendidas pela suplementação com componentes de origem animal ou nutrientes específicos (D'ALMEIDA,2019). Teores adequados de proteína e lipídios favorecem o crescimento larval, mas o excesso ou o desequilíbrio desses nutrientes pode comprometer a sobrevivência ou alterar o investimento reprodutivo (AMORIM et al., 2001). Com isso, a avaliação conjunta da composição química das dietas e do desempenho da colônia foi essencial para selecionar uma formulação eficiente, de menor custo, fácil preparação e maior biossegurança, como no caso da dieta comercial que pode promover uma aparente preferência do espécime pelo sachê.

Conclusão

Nessa pesquisa, observou-se que a dieta já estabelecida pelo laboratório não se mostrou viável, dentro dos parâmetros observados, uma vez que não permitiu a continuidade do ciclo de vida, porém se mostrou eficiente para manter as moscas adultas vivas. Em análise conjunta, os parâmetros relacionados ao sachê foram bastante eficazes quanto a manutenção de C. macellaria, bem como a visível capacidade em manter o ciclo de vida de aproximadamente 21 dias entre uma geração e outra, além de gerar um número significativo de indivíduos em cada fase do ciclo. Nas condições avaliadas, a dieta comercial úmida para cães permitiu a manutenção do ciclo de Cochliomyia macellaria, mostrando-se uma alternativa promissora para a criação da espécie em laboratório. A análise bromatológica mostrou diferenças entre as dietas avaliadas, principalmente nos teores de proteínas e lipídios, que foram maiores na dieta comercial. Os resultados deste estudo podem contribuir para a manutenção de colônias de C. macellaria em laboratório e para sua utilização em pesquisas, especialmente na área de entomologia forense.

Referências

D. M. Vega, “Estudio de los agregados de dípteros sarcosaprófagos y su relación con los ecosistemas naturales de la Comunidad de Madrid,” Jan. 2011. IVORRA, T. et al. New developmental data of Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae) in tropical temperatures and its implications in forensic entomology. Tropical Biomedicine, v. 40, n. 1, p. 1–6, 1 mar. 2023. DOI: https://doi.org/10.47665/tb.40.1.003. T. Chaiwong, T. Srivoramas, P. Sueabsamran, K. L. Sukontason, M. R. Sanford, and K. L. Sukontason, “The blow fly, Chrysomya megacephala, and the house fly, Musca domestica, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand.,” Tropical Biomedicine, vol. 31, no. 2, pp. 336–346, June 2014. T. Chaiwong, T. Srivoramas, K. Sukontason, M. R. Sanford, and K. L. Sukontason, “BACTERIAL FAUNA ASSOCIATED WITH THE BLOW FLY, Chrysomya megacephala (F.) IN UBON RATCHATHANI PROVINCE OF NORTHEAST THAILAND,” vol. 4, no. 1, pp. 71–74, May 2012, doi: 10.9735/0975-3702.4.1.71-74. V. P. D. S. Junior, A. S. Leandro, and G. E. M. Borja, “Potencial de veiculação dos ovos de Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781) por Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775), em laboratório,” vol. 5, no. 3, pp. 131–133, Jan. 1998, doi: 10.4322/RBCV.2015.119. OLSEN, Alan R. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric disease. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 28, n. 3, p. 199–211, 1998. DOI: 10.1006/RTPH.1998.1271 MALDONADO, Marcelo A.; CENTENO, Néstor D. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 2, p. 213–216, 2003. DOI: 10.1590/S0074-02762003000200008 STOFFOLANO JUNIOR, John G. Synanthropic flies—A review including how they obtain nutrients, along with pathogens, store them in the crop and mechanisms of transmission. Insects, v. 13, n. 9, art. 776, 2022. DOI: 10.3390/insects13090776 S. L. da C. e Silva and E. M. V. Milward-de-Azevedo, “Estudo comparado do desenvolvimento pós-embrionário de Cochliomyia macellaria (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) em duas dietas à base de carne, em laboratório,” Revista Brasileira De Zoologia, vol. 11, no. 4, pp. 659–668, Jan. 1994, doi: 10.1590/S0101-81751994000400010. SANTOS, Hadassa Soares dos. Comparação de dietas artificiais para o estabelecimento de colônias de moscas necrófagas em insetário. 2025. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) — Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/server/api/core/bitstreams/6a114d09-571e-4909-a833-b4235c415092/content. Acesso em: 30 ago. 2026. AOAC (2005) - Association of Officiating Analytical Chemists. Official method of Analysis. 18th Edition, Washington DC, Method 935.14 and 992.24 AQUINO, M.F.K; CAVALCANTE, R.T; THYSSEN, P.J. Desenvolvimento de Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae) em diferentes dietas artificiais visando ao transporte de larvas para uso terapêutico. ANAIS - VIII Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, 15 (6). https://doi.org/10.26843/investigacao.v15i6.1552. 2016 BAIA, T.C; CAMPOS, A.; WANDERLEY, B.M; GAMA, R.A. The Effect of Flunitrazepam (Rohypnol) on the Development of Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) and its Implications for Forensic Entomology. Journal of Forensic Sciences. 61, p.1112 – 1115. 2016 BARBOSA, L.S; JESUS, D.M.L; AGUIAR-COELHO V.M. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) (Díptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. Revista Brasileira de Zoociencias. 6: 207-217.2004 BARBOSA TM &

VASCONCELOS SD. An updated checklist of myiasis-inducing Diptera species in livestock in Northeastern Brazil. Arch. Zootec. 64 (246): 187-190. 2015. ESTRADA D.A; GRELLA, M.D; THYSSEN P.J; LINHARES, A.X. Taxa de desenvolvimento de Chrysomya albiceps (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. Neotropical Entomology 38: 203-207.2009 FERRAZ, A.C.P. Avaliação de novas dietas e o efeito da adição de antibióticos no desenvolvimento de Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) e Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae), Tese de doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia, Seropédica, 2012. FONSECA, E.O.L. et al. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de Aedes aegypti do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 28(1):e2017316, 2019. GAMA, R. A.; BRAMBILLA, P. B. T.; SILVA, S. R. A.; MEDEIROS, J. R.; JALES, J. T.; PINHEIRO, M. A. R. Q.; FERRAZ, J.B; NETO, R.M.; BARBOSA, T. M. Terapia Larval: protocolo básico para manutenção, desinfecção, transporte e aplicação de larvas de Chrysomya megacephala. (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). Entomological Communications, 3, 2021. OLIVEIRA-COSTA, J. A entomologia forense e suas aplicações. In: Entomologia forense: quando os insetos são vestígios. 2ª ed. Campinas: Millennium. p. 39-50. 2007. OLIVEIRA - COSTA, Janyra. Insetos “peritos”: a entomologia forense no Brasil. 1ª.ed. Campinas: Millennium Editora. p.14. 2013. PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biologico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ. Acesso em: 29 out. 2023, 2001 PINHEIRO, M. A. R. Q.; FERRAZ, J. B.; AA JUNIOR, M.; MOURA, A. D.; COSTA, M. E. S. M.; COSTA, F. J. M. D.; ANDRADE-NETO, V. F.; Neto, RM; GAMA, R. A. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. Indian Journal of Medical Research, v. 141, p. 340, 2015. VAIRO, K. P.; MOURA, M. O. Entomologia forense na prática: do laboratório à utilização do vestígio. Millenium Editora. 2021. AMORIM, J. A. et al. Estudo comparado do desenvolvimento pós-embrionário de Cochliomyia macellaria (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) em duas dietas à base de carne, em laboratório. Revista Brasileira de Entomologia, 2001. GINGRICH, R. E. Nutritional Studies on Screw-Worm Larvae with Chemically Defined Media. Annals of the Entomological Society of America, 1964. DA SILVA, A. C. et al. Aspectos da biologia da reprodução e longevidade de Cochliomyia macellaria (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), em condições experimentais. Revista Brasileira de Zoologia, 1999. FERRAZ, A. C. P. et al. Utilização de Cochliomyia macellaria F. (Diptera: Calliphoridae) e avaliação de sua densidade larval para uso terapêutico na recuperação de lesões tegumentares. 2010. D'ALMEIDA, J. M. et al. Life History of Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) (Diptera, Calliphoridae), a Blowfly of Medical and Forensic Importance. Journal of Medical Entomology, 2019. Coudron, C. L., Adamaki-Sotiraki, C., Yakti, W., Pascual, J., & Wiklicky, V. (2025). Bugbook: Basic information and good practices on how to maintain stock populations for Tenebrio molitor and Hermetia illucens for research. Journal of insects as food and feed, 11(5), 1-16. https://doi.org/10.1163/23524588-bja10240. TV UNICAMP. CSI da vida real: moscas-varejeiras ajudam a esclarecer crimes da PF; entenda. YouTube, 06 de fevereiro de 2025. Disponível em: https://youtu.be/WkBTLIaS6r4?is=X4tHroPRxlz2XfbS. Acesso em: 31 ago. 2026.

Anexos



Figura 01



Figura 02



Figura 03



Tabela 01



Tabela 02



Tabela 03

CÓDIGO: SB1436

AUTOR: JOÃO VÍTOR CABRAL DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: JULLIANE TAMARA ARAUJO DE MELO CAMPOS

TÍTULO: Análises bioinformáticas de variantes patogênicas no gene BSCL2 relacionadas à Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia

Resumo

O tecido adiposo consiste em um relevante órgão endócrino essencial para a manutenção da homeostase do organismo, desempenhando funções de natureza endócrina, metabólica e reguladora. A liberação de proteínas bioativas, conhecidas como adipocinas, representa a principal atividade regulatória desse tecido, estabelecendo uma ampla rede de comunicação intersistêmica e estando intimamente ligada ao desenvolvimento de desordens metabólicas. Atuando na coordenação dos adipócitos encontra-se a seipina, uma proteína codificada pelo gene BSCL2, que possui papéis fundamentais no desenvolvimento e na maturação das gotículas lipídicas. Mutações no BSCL2 resultam em uma proteína defeituosa, provocando o surgimento de lipodistrofias e patologias neurológicas — ambas condições consideradas de extrema raridade. Nesse contexto, o presente estudo objetiva investigar uma nova variante patogênica ligada a este gene, avaliando como essa alteração afeta a conformação e a função da seipina por meio de análises moleculares e ferramentas de bioinformática. Tendo em vista a natureza rara dessas enfermidades, esta pesquisa alinha-se diretamente ao Objetivo 3 de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU, que preconiza a promoção da saúde e do bem-estar.

Palavras-chave: Neuropatia. Seipina. Predições bioinformáticas. Doenças raras.

TITLE: Bioinformatic analyses of a BSCL2 gene patogenic variant related to Progressive Encephalopathy with or without Lipodystrophy

Abstract

Adipose tissue is an important endocrine organ essential for maintaining body homeostasis, performing endocrine, metabolic, and regulatory functions. The release of bioactive proteins, known as adipokines, represents the main regulatory activity of this tissue, establishing a broad network of intersystemic communication and being closely linked to the development of metabolic disorders. Coordinating the adipocytes is seipin, a protein encoded by the BSCL2 gene, which plays fundamental roles in the development and maturation of lipid droplets. Mutations in BSCL2 result in a defective protein, causing the onset of lipodystrophies and neurological pathologies — both

considered extremely rare conditions. In this context, the present study aims to investigate a novel pathogenic variant associated with this gene, evaluating how this alteration affects the conformation and function of seipin through molecular analyses and bioinformatics tools. Given the rare nature of these diseases, this research aligns directly with Sustainable Development Goal 3 of the UN 2030 Agenda, which advocates for the promotion of health and well-being.

Keywords: Neuropathy. Seipin. Bioinformatics predictions. Rare diseases.

Introdução

A Encefalopatia Progressiva com ou sem Lipodistrofia (PELD) é uma doença neurodegenerativa grave, causada por variantes patogênicas no gene BSCL2. Esse gene, localizado na posição 11q12.3(Agarwala et al., 2017; Craveiro Sarmento et al., 2019), codifica a proteína seipina, esta, localizada no retículo endoplasmático (RE). A seipina possui uma forma oligomérica, e se organiza integralmente na membrana do RE, apresentando duas regiões transmembrana, e suas regiões N e C-terminais voltadas ao citoplasma, além de sofrer um loop no lúmen do RE(Sarmento et al., 2018).A ação da seipina está relacionada no transporte de triglicerídeos sintetizados no RE às vesículas lipídicas, promovendo a formação inicial ou maturação dessas organelas, mas também está intimamente ligado à homeostase do RE. (Sarmento et al., 2018; Craveiro Sarmento et al., 2020).Devido à sua importância, variantes nessa proteína causam diversos prejuízos funcionais à célula, como o estresse oxidativo.

Classicamente a PELD está ligada à variante c.985C >T no gene BSCL2, no éxon 7, seja em homozigose ou heterozigose composta, causando distúrbios neurológicos graves, evidenciados desde o nascimento com pequenos retardos no desenvolvimento, além da possibilidade de apresentar perda de tecido adiposo como na LGC2. Na infância, ocorre uma perda drástica das habilidades adquiridas, e, com o passar do tempo, agravamento gradativo da neurodegeneração, com distúrbios da marcha, perda da fala e compreensão linguística, quedas frequentes, espasticidade e crises de epilepsia mioclônica(Guillén-Navarro et al., 2013; Sánchez-Iglesias et al., 2021).

Divergindo da variante clássica, outras variantes, como a c.1235_1389del, N152S e S154L também são associados à doença. Com isso, este trabalho se propõe a descrever as características relacionadas à variante, como o rastreio familiar da mutação e como ela impacta a proteína a nível estrutural e funcional.

Metodologia

1. Análises de sequência e estrutura proteicas

Essas análises têm como objetivo descrever as alterações estruturais e funcionais relacionadas às variantes da deleção do éxon 11 e c.517insA. Todas elas foram feitas levando em conta a maior isoforma da seipina, contendo 462 aminoácidos (com ID do transcrito ENST00000360796.10), considerando que a maior isoforma é a mais

expressa no tecido nervoso. As sequências do tipo selvagem e mutadas foram obtidas a partir da manipulação da sequência de nucleotídeos coletadas com o auxílio do Genome Browser, gerando a sequência de aminoácidos pelo Translate Tool Expasy.

Para análise da variante c.1235_1389del, foi gerada uma sequência com a deleção de 843 nucleotídeos a partir do éxon 11, se estendendo por parte da região de 3' UTR, tendo em vista que essa deleção altera o quadro de leitura do gene BSCL2. Já para a variante c.517insA, foi utilizada a sequência selvagem de nucleotídeos, inserindo uma adenina na posição 517. As variantes N152S e S154L também foram analisadas. Em seguida, utilizando o Translate Tool Expasy, foi gerada a sequência referente às proteínas mutantes, para cada uma das variantes.

Para a análise estrutural, as sequências obtidas foram colocadas no software ChimeraX, comparando a proteína selvagem, e as mutantes (deleção do éxon 11 e c.517insA). Esse software foi usado, também, para análise de docking molecular. Além disso, como a seipina é uma proteína transmembrana, foram utilizados os softwares PSIPRED, TMHMM, CCTOP e SOSUI para determinar o padrão das regiões transmembrana nas variantes estudadas. Análises das regiões amiloidogênicas também foram realizadas, com auxílio do FoldAmyloid.

Resultados e Discussões

1. Alterações na sequência

A sequência obtida da deleção demonstra alterações significativas na região C-terminal da seipina, enquanto as outras regiões se mantêm conservadas. Com a deleção do éxon 11, há uma alteração no quadro de leitura, fazendo com que a tradução continue na região do 3' UTR, até encontrar o stop códon subsequente. Essa alteração leva a mudança drástica na sequência de aminoácidos traduzidos a partir da posição 412, além de gerar uma proteína truncada – com 444 aminoácidos, em contraste com os 462 aminoácidos da proteína selvagem. A partir dessa posição, a leitura é alterada de [...]GSWEDAALLTEANLPA[...] na proteína selvagem, para [...]AHPWPRDSVPLKGAALFFGNHQGGGGRRRGARW- na proteína mutada. No entanto, até essa região, a sequência se mantém conservada na proteína mutada, demostrando que a alteração ocorre especificamente na região C-terminal citoplasmática da seipina.

A plataforma PSIPRED também permite analisar a característica química de cada um dos aminoácidos da proteína. Dessa forma, foi realizada análise, comparando a porção C-terminal entre a proteína selvagem e mutante para a deleção do éxon 11. Como resultado, foi obtido que a região proteica onde há a mudança na sequência de aminoácidos está composta predominantemente de aminoácidos polares, enquanto na proteína selvagem, da posição 412 em diante, há a predominância de aminoácidos apolares.

2. Alterações na estrutura proteica

A estrutura tridimensional da variante c.1235_138del, predita pelo ChimeraX,demonstra que a estrutura se mantém conservada, até a posição 412, onde e que há diminuição considerável da cauda C-terminal citoplasmática, ao ser comparada com a selvagem.As análises das variantes N152S e S154L demonstraram a alteração pontual de um aminoácido nas posições 152 e 154, em que mudou de asparagina para serina e serina para leucina, respectivamente.

Algumas das demais análises, com finalidade de observar a organização da proteína na membrana do retículo endoplasmático (RE), demonstram resultados controversos com as informações encontradas atualmente na literatura. Nos softwares PSIPRED e SOSUI, as predições resultam em três domínios transmembrana, embora seja de conhecimento da comunidade científica que a seipina apresenta somente duas regiões transmembrana. Os resultados mais condizentes com a realidade apresentada na literatura foram obtidos através das plataformas TMHMM e CCTOP, que forneceram duas regiões transmembrana, uma região interna ao retículo endoplasmático e as regiões N e C-terminais voltadas ao citosol.

A variante c.517insA possui predição e mecanismos descritos previamente por Craveiro Sarmento et al., 2020, e ocorre devido à inserção de uma adenina na posição 517, o que provoca uma mudança drástica no quadro de leitura, resultando em um códon de parada prematuro e, consequentemente, em uma proteína truncada, com perda de aproximadamente 71% de sua sequência.

3. Mecanismo fisiopatológico associado às variantes

Uma análise útil para entendimento da fisiopatologia da variante é a das regiões amiloidogênicas. Portanto, as sequências foram analisadas pelo FoldAmyloid, gerando gráficos que indicam a distribuição dessas regiões pela estrutura da proteína. Ganhos ou perdas delas alteram mecanismos primordiais para a fisiologia celular. Na seipina, as regiões se concentram nas regiões transmembrana da proteína. De forma intrigante, não houve nenhuma alteração dessas regiões nas variantes c.1235_1389del, N152S e S154L, ao se comparar com a seipina selvagem, indicando que talvez não seja essa a causa da severidade dos sintomas, porém, existem alterações presentes na variante c.517insA, onde há perda considerável de regiões amiloidogênicas, sendo relacionado aos quadros lipodistróficos.

Compreendendo que a variante em questão gera uma perda significativa da região C-terminal da proteína e, em conjunto, uma mudança drástica na polaridade dos aminoácidos dessa região, sugere-se que as interações com outras proteínas essenciais para o metabolismo das vesículas lipídicas estejam gravemente afetadas.

O estudo realizado por Saito et al., 2022 mostra que a região C-terminal da seipina não-glicosilada é essencial para a regulação dos níveis de cálcio no RE via interação com a proteína SERCA2b. Defeitos nessa região causam inativação de SERCA2b, induzindo a diminuição de cálcio no RE, levando à estresse de RE e, por fim, apoptose. Prejuízo nas sinalizações intracelulares e transmissão sináptica no sistema nervoso também foram relacionadas com o defeito nessa interação. As seipinopatias e doenças neurodegenerativas estão diretamente associadas à interação defeituosa entre SERCA2b e seipina, bem como à diminuição do cálcio e estresse no RE (Saito et al., 2022). Dessa

maneira, realizamos o docking molecular entre seipina e SERCA2b, para compreender se há mudança na interação entre a nova variante e essa proteína.

A partir dos dados, observa-se que SERCA2b interage de forma diferente na nova variante se comparada ao tipo selvagem, mudando seu sítio de contato. Além disso, a interação com a variante c.1235_1389del é muito semelhante à vista nas variantes clássicas N152S e S154L, as quais foram trabalhadas no estudo de Saito et al., 2022, indicando uma possível correlação fisiopatológica entre essas proteínas.

Apesar das análises bioinformáticas da variante relacionada à deleção do éxon 11 não apresentarem prejuízo nas regiões de glicosilação da seipina, a mudança drástica na região C-terminal pode indicar que ocorre um mecanismo semelhante ao apresentado por Saito et al., 2022, uma vez que está presente na PELD diagnosticada na paciente.

Conclusão

Todos esses dados nos levam a crer que a mudança da sequência de aminoácidos da região C-terminal, bem como a diminuição dessa região leva a um dano funcional. Levando em consideração que essas alterações estruturais e químicas acarretam o prejuízo da interação com outras proteínas essenciais para o metabolismo das vesículas lipídicas, como AGPAT2 e GPAT3/4.

Após as análises, é possível observar a complexidade das variantes encontradas na PELD, em especial à c.1235_1389del. Os mecanismos fisiopatológicos associados ao surgimento da encefalopatia são ainda obscuros, por isso,são necessários mais estudos para a compreensão do que leva essas alterações a causarem uma doença tão grave e progressiva.

Referências

AGARWALA, R. et al. DatabaseResourcesoftheNational Center for BiotechnologyInformation. NucleicAcidsResearch, v. 45, n. D1, p. D12–D17, 4 jan. 2017.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. et al. The worldwidemutationallandscapeofBerardinelli-Seip congenital lipodystrophy. Mutationresearch. Reviews in mutationresearch, v. 781, p. 30–52, 1 jul. 2019.

CRAVEIRO SARMENTO, A. S. et al. Changes in redox andendoplasmicreticulumhomeostasis are relatedto congenital generalizedlipodystrophytype 2. Biochimica et biophysica acta. Molecular andcellbiologyoflipids, v. 1865, n. 4, 1 abr. 2020.

GUILLÉN-NAVARRO, E. et al. A new seipin-associatedneurodegenerativesyndrome. Journalof medical genetics, v. 50, n. 6, p. 401–409, 2013.

SAITO, S. et al. A motor neurondisease-associatedmutationproduces non-glycosylatedSeipinthatinduces ER stress andapoptosisbyinactivating SERCA2b. eLife, v. 11, 29 nov. 2022.

SALO, V. T. Seipin—still a mysterious protein? Frontiers in CellandDevelopmentalBiology, v. 11, 3 fev. 2023.

SÁNCHEZ-IGLESIAS, Sofía et al. Celia's Encephalopathy (BSCL2-Gene-Related): Current Understanding. Journal of Clinical Medicine, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1435, 2021.

SARMENTO, A. S. C. et al. ExploringSeipin: FromBiochemistrytoBioinformaticsPredictions. Internationaljournalofcellbiology, v. 2018, 2018.

CÓDIGO: SB1447

AUTOR: INGRID FERNANDES BARBOSA SILVA

COAUTOR: CARLOS SALÚSTIO GOMES

ORIENTADOR: MAURO PICHORIM

TÍTULO: Influência da configuração e composição da paisagem na ocupação de falcões do gênero Micrastur (Aves: Falconidae) na Mata Atlântica

Resumo

A perda de habitat compromete a distribuição e a persistência de espécies do gênero *Micrastur* na Mata Atlântica. Analisamos a influência da composição e configuração da paisagem florestal e do relevo sobre a ocupação do falcão-relógio (*Micrastur semitorquatus*), do falcão-caburé (*M. ruficollis*) e do falcão-críptico (*M. mintoni*). Utilizamos registros de ocorrência da literatura e de plataformas de ciência cidadã e analisamos os dados usando modelos de ocupação de múltiplas estações, considerando 20 anos de amostragem (2005-2024). A cobertura de floresta nuclear, a altura do dossel e a rugosidade influenciaram positivamente a ocupação de *M. ruficollis* e *M. semitorquatus*. Para *M. semitorquatus*, a elevação também apresentou efeito positivo, enquanto o isolamento e a integridade florestal apresentaram efeitos negativos. A detecção de *M. ruficollis* e *M. semitorquatus* variou entre trimestres e aumentou linearmente ao longo dos anos, sendo positivamente influenciada pela densidade populacional humana. Nenhuma variável apresentou efeito consistente sobre *M. mintoni*. Os resultados indicam que características da paisagem e do relevo influenciam a ocupação dessas espécies, evidenciando que estratégias de conservação devem considerar não apenas a quantidade, mas também a qualidade e estrutura do habitat remanescente.

Palavras-chave: Rapinantes. Espécies florestais. Ciência cidadã. Detecção imperfeita

TITLE: Influence of landscape configuration and composition on the occupancy of falcons of the genus Micrastur (Aves: Falconidae) in the Atlantic Forest

Abstract

Habitat loss compromises the distribution and persistence of species of the genus *Micrastur* in the Atlantic Forest. We analyzed the influence of the composition

and configuration of the forest landscape and topography on the occupancy of the Collared Forest-Falcon (*Micrastur semitorquatus*), Barred Forest-Falcon (*M. ruficollis*), and Cryptic Forest-Falcon (*M. mintoni*). We used occurrence records from the literature and citizen science platforms and analyzed the data using multi-season occupancy models, considering 20 years of sampling (2005-2020). Core forest cover, canopy height, and terrain roughness positively influenced the occupancy of *M. ruficollis* and *M. semitorquatus*. For *M. semitorquatus*, elevation also had a positive effect, whereas forest isolation and forest integrity had negative effects. Detection of *M. ruficollis* and *M. semitorquatus* varied among quarters and increased linearly over the years, being positively influenced by human population density. None of the variables showed a consistent effect on *M. mintoni*. These results indicate that landscape and topographic characteristics influence species occupancy, highlighting that conservation strategies should consider not only the amount but also the quality and structure of remaining habitat.

Keywords: Raptors. Forest species. Citizen Science. Imperfect detection

Introdução

A perda de habitat e as alterações na configuração da paisagem estão entre os principais fatores associados ao declínio da biodiversidade em florestas tropicais (Fahrig, 2003). A perda de cobertura florestal também aumenta o isolamento entre fragmentos, reduz a conectividade e intensifica os efeitos de borda, comprometendo a disponibilidade de recursos e a persistência de espécies altamente dependentes de florestas, especialmente aquelas com baixa densidade populacional, grandes áreas de vida e elevada especialização ecológica (Fahrig, 2003; Fischer & Lindenmayer, 2007; Wilson et al., 2016). Entre essas espécies destacam-se as aves de rapina florestais, cuja ocorrência depende da disponibilidade de presas, de ambientes adequados para caça por emboscada e de locais para nidificação (Newton, 1979; McClure et al., 2018). Assim, compreender como atributos da paisagem influenciam a ocorrência dessas aves é fundamental para subsidiar estratégias de conservação.

O domínio Mata Atlântica é um dos *hotspots* de biodiversidade mais ameaçados do mundo (Huais et al., 2025). Originalmente com cerca de 1,2 milhão de km², o domínio foi intensamente transformado pela expansão agrícola, urbanização e mudanças no uso da terra, restando aproximadamente 12% de sua cobertura original, distribuída em fragmentos com diferentes níveis de integridade e conectividade (Ribeiro et al., 2009). A predominância de pequenos remanescentes e o aumento do isolamento comprometem a persistência de espécies especialistas dependentes de florestas contínuas.

Embora a quantidade de habitat seja reconhecida como um importante preditor para a biodiversidade, a composição e a configuração da paisagem, bem como características do relevo, também influenciam a disponibilidade de recursos, a conectividade e a ocupação das espécies (Fahrig, 2003; Fischer & Lindenmayer, 2007; Bełcik et al., 2020; Ribon et al., 2021; Anjos et al., 2022; 2024). Em aves de rapina florestais, atributos como maior cobertura de floresta nuclear, maior

altura do dossel e menor isolamento de manchas florestais favorecem a ocorrência e a persistência das populações (Lampila et al., 2005; Lees & Peres, 2008; McClure et al., 2018; O'Bryan et al., 2022). Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliam esses fatores para aves de rapina florestais na Mata Atlântica, especialmente para espécies discretas e de difícil detecção.

Entre as aves de rapina florestais, o gênero *Micrastur* destaca-se pela forte associação com florestas estruturalmente complexas, pelo seu comportamento discreto nas emboscadas, pela baixa detectabilidade e pela dependência de árvores para a reprodução (Winkler et al., 2020). Em razão dessa elevada dependência de florestas conservadas, mudanças na qualidade da paisagem florestal podem afetar diretamente sua ocorrência na paisagem. Assim, o gênero representa um modelo adequado para avaliar como os atributos da composição e da configuração da paisagem influenciam a ocupação de predadores de topo na Mata Atlântica.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar como a composição e a configuração da paisagem florestal e o relevo influenciam a probabilidade de ocupação do falcão-relógio (*Micrastur semitorquatus*), do falcão-caburé (*M. ruficollis*) e do falcão-críptico (*M. mintoni*) na Mata Atlântica. Hipotetizamos que a ocupação seja influenciada positivamente pela maior cobertura de floresta nuclear, maior integridade florestal, maior altura do dossel e relevo mais complexo, enquanto o isolamento florestal exerce efeito negativo. Além disso, esperamos que variáveis relacionadas ao esforço de observação da natureza influenciem a probabilidade de detecção das espécies.

Metodologia

Área de estudo e delineamento espacial

Conduzimos o estudo no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, considerando seu limite integrativo (Muylaert et al. 2018) (Fig. 1). Localizada na região leste da América do Sul, a região engloba um mosaico de manchas florestais isoladas com diferentes graus de integridade e níveis de fragmentação, incluindo áreas urbanizadas e agrícolas na matriz (Ribeiro et al., 2009).

A Mata Atlântica apresenta elevada heterogeneidade topográfica, abrangendo planícies costeiras, tabuleiros, planaltos e serras, formando um gradiente altitudinal que se estende desde áreas próximas ao nível do mar até regiões montanhosas com mais de 2.000 m de altitude (IBGE, 2006). O clima varia entre tropical e subtropical, em função da ampla extensão latitudinal (Alvares et al., 2013). A temperatura média anual varia entre 12 °C e 26 °C, enquanto a precipitação anual pode ultrapassar 3.100 mm (Alvares et al., 2013). A vegetação é composta por formações florestais ombrófilas e estacionais, além de restingas, manguezais e campos de altitude (IBGE, 2004).

Para delinear a área de estudo, criamos uma grade composta por 875 unidades amostrais hexagonais de 0,5° x 0,5° (2.668 km²/unidade amostral), distribuídas por toda a extensão da Mata Atlântica (Fig. 1). Especificamente para *M. mintoni*, selecionamos 22 unidades amostrais que interceptavam sua área de ocorrência, conforme disponibilizado pela IUCN (BirdLife International, 2024), e adicionamos uma unidade amostral adjacente ao redor de cada unidade localizada nas extremidades da distribuição, totalizando 36 unidades hexagonais. Para todas as espécies, consideramos apenas unidades amostrais com pelo menos 50% de sua área correspondente ao território continental.

Dados das espécies

Coletamos registros de ocorrência de *M. semitorquatus*, *M. ruficollis* e *M. mintoni* no período de 2005 a 2024. Obtivemos esses dados por meio de bases de plataformas de ciência cidadã (ebird.org, gbif.org, inaturalist.org, sibbr.gov.br, specieslink.net, vertnet.org e xeno-canto.org) e da literatura (Rodrigues et al. 2019, Google Acadêmico e *Web of Science*). Selecionamos apenas os registros que tinham informações completas de localização (coordenadas ou localidade rastreável) e de data (mês e ano).

Variáveis ambientais

Para cada unidade amostral e ano calculamos a média de sete variáveis da paisagem florestal e do relevo para estimar a probabilidade de ocupação das espécies: cobertura florestal (Souza Jr. et al. 2020), isolamento florestal (Souza Jr. et al. 2020), cobertura floresta nuclear (Souza Jr. et al. 2020), integridade florestal (Grantham et al. 2020), altura do dossel (Potapov et al. 2021), elevação (Fick & Hijmans, 2017) e rugosidade (Amatulli et al. 2020) (Tabela 1). Para estimar a probabilidade de detecção e reduzir possíveis vieses espaciais e temporais associados ao esforço amostral, calculamos a média da densidade populacional humana anual (CIESIN, 2018) (Tabela 1).

Análise exploratória dos dados

Inicialmente, avaliamos a multicolinearidade entre as variáveis explicativas por meio do teste VIF, utilizando a função vif do pacote *usdm* no programa R 4.5.2. Adotamos como critério um limiar igual a 3,0, de forma que variáveis com valores superiores a esse limite foram consideradas colineares e removidas da modelagem para evitar sobreparametrização. A cobertura florestal apresentou colinearidade e, por esse motivo, excluímos essa variável da modelagem de ocupação.

Após a remoção da variável colinear, realizamos o teste de correlação de Spearman entre as variáveis explicativas utilizando a função rcorr do pacote *corrplot* no programa R. Essa análise teve como objetivo identificar as correlações entre a cobertura florestal e as demais variáveis ambientais, permitindo verificar o efeito das relações (positiva ou negativa). Utilizamos essas informações para ajudar na interpretação ecológica dos resultados e discutir possíveis efeitos indiretos da cobertura florestal sobre a ocupação das espécies, por meio da sua associação com as variáveis que permaneceram na

modelagem. Essa análise indicou que a cobertura florestal estava correlacionada positivamente com a cobertura de floresta nuclear (ρ = 0,85) e com a altura do dossel (ρ = 0,70), e negativamente com o isolamento florestal (ρ = -0,87).

Modelagem de ocupação

Conduzimos a modelagem utilizando modelos de ocupação de múltiplas estações, conforme proposto por MacKenzie et al. (2003), implementados no programa MARK 11.2. Cada unidade amostral foi representada por um histórico de detecção (1) e não detecção (0) para cada espécie, organizado em 20 estações amostrais (anos) e quatro ocasiões de amostragem (trimestres) por ano. Esta modelagem estima a probabilidade de ocupação (ψ), a probabilidade de detecção (ρ), a probabilidade de colonização (γ) e a probabilidade de extinção (ε) MacKenzie et al. (2003). Incluímos esses dois últimos parâmetros apenas no modelo, mas sem realizar inferências ecológicas.

Realizamos a seleção de modelos em duas etapas, com base no Critério de Informação de Akaike corrigido para pequenas amostras (AICc). Na primeira etapa, construímos cinco modelos para testar o efeito de diferentes tendências temporais (exponencial, quadrática, linear e logística) e o efeito aleatório sobre a probabilidade de detecção das espécies. Na segunda etapa, selecionamos o modelo melhor ranqueado da etapa anterior e testamos todas as combinações possíveis entre as variáveis para explicar a probabilidade de ocupação e de detecção das espécies.

Consideramos modelos com suporte substancial aqueles que apresentaram ΔAICc ≤ 2 em relação ao modelo melhor ranqueado (Burnham & Anderson, 2002). Por fim, avaliamos a importância das variáveis por meio de dois critérios: (1) peso cumulativo igual ou superior a 50% (Σwi ≥ 0,50) e (2) coeficientes β cujos intervalos de confiança de 95% não cruzavam o zero.

Resultados e Discussões

Obtivemos registros de ocorrência de *M. semitorquatus* em 423 unidades amostrais, o que corresponde a 48% dos hexágonos. Para *M. ruficollis* obtivemos registros em 264 unidades amostrais, o que corresponde a 30% dos hexágonos. Por fim, para *M. mintoni* obtivemos registros em apenas três unidades amostrais, o que corresponde a 8% dos hexágonos.

Os resultados demonstram que a ocorrência dos falcões florestais do gênero *Micrastur* na Mata Atlântica está associada principalmente às características estruturais e à composição da paisagem florestal, bem como ao relevo. A cobertura de floresta nuclear e a altura do dossel foram os principais preditores da paisagem florestal, afetando positivamente a ocupação de *M. semitorquatus* e *M. ruficollis*, indicando a importância do interior dos remanescentes florestais com maior complexidade estrutural para a ocorrência dessas espécies. Além

disso, a rugosidade exerceu efeito positivo sobre a ocupação de ambas as espécies, indicando que áreas com relevo mais acidentado favorecem a ocorrência delas.

Seleção de modelos

Na primeira etapa da modelagem, avaliamos cinco modelos para cada espécie, visando identificar a melhor estrutura para modelar a probabilidade de detecção considerando os efeitos das tendências temporais e o efeito aleatório. Para *M. ruficollis* e *M. semitorquatus*, o modelo melhor ranqueado incluiu a tendência temporal linear e para *M. mintoni*, o modelo melhor ranqueado incluiu a tendência temporal logística.

Na segunda etapa, obtivemos 512 modelos para cada espécie. Para *M. ruficollis*, seis modelos apresentaram suporte substancial, com peso de 85% (W = 0,85). Para *M. semitorquatus*, dois modelos apresentaram suporte substancial, com peso de 92% (W = 0,92). E para *M. mintoni*, sete modelos apresentaram suporte substancial, com peso de 22% (W = 0,22) (Tabela 2).

Estimativas de ocupação e detecção

As estimativas totais de ocupação na área de estudo indicaram diferenças entre as três espécies. *Micrastur semitorquatus* apresentou a maior probabilidade de ocupação (ψ = 0,13; IC 95% = 0,11, 0,15), seguido por *M. mintoni* (ψ = 0,09; IC 95% = 0,03, 0,23) e *M. ruficollis* (ψ = 0,06; IC 95% = 0,06, 0,07).

As estimativas de detecção variaram entre as espécies e ao longo do período amostral. *Micrastur ruficollis* apresentou as maiores probabilidades de detecção, com aumento gradual entre 2005 e 2024 (ρ = 0,09–0,57). *Micrastur semitorquatus* apresentou padrão semelhante, também com aumento da detecção ao longo dos anos (ρ = 0,02–0,48), embora os valores tenham sido inferiores aos observados para *M. ruficollis*. Em contraste, *M. mintoni* apresentou baixa probabilidade de detecção, mantendo-se constante durante todo o período analisado (ρ = 0,04), sem evidência de variação temporal. A variação temporal na probabilidade de detecção também foi observada dentro de cada ano para *M. ruficollis* e *M. semitorquatus*, com diferenças entre os trimestres.

As diferenças observadas nas probabilidades de ocupação e de detecção evidenciam que, embora as três espécies compartilhem hábitos florestais, elas diferem quanto à ocorrência e à detectabilidade na área de estudo. Esses resultados reforçam a importância de considerar separadamente os processos de ocupação e de detecção na avaliação dos efeitos das variáveis sobre cada espécie.

Peso cumulativo e efeito das variáveis

Com base nas variáveis consideradas importantes segundo o critério 1 (peso cumulativo igual ou superior a 50%), para *M. ruficollis*, a cobertura de floresta nuclear, rugosidade, altura do dossel, densidade populacional, trimestre e tendência temporal linear apresentaram peso cumulativo igual ou superior a

50%. Para *M. semitorquatus*, cobertura de floresta nuclear, isolamento florestal, rugosidade, elevação, índice de integridade florestal, altura do dossel, densidade populacional, trimestre e tendência temporal linear atenderam ao mesmo critério. Para *M. mintoni*, apenas o isolamento florestal e a tendência temporal logística tiveram peso cumulativo igual ou superior a 50% (Tabela 3).

Com base nas variáveis consideradas importantes segundo o critério 2 (intervalo de confiança do coeficiente β não cruzar o zero), *M. ruficollis* apresentou relação positiva entre a probabilidade de ocupação, a cobertura de floresta nuclear (β = 0,0334; IC 95% = 0,0236, 0,0433), a rugosidade (β = 0,0223; IC 95% = 0,0156, 0,0290) e a altura do dossel (β = 0,2178; IC 95% = 0,1805, 0,2550) (Fig. 2). Em relação à detecção, a densidade populacional humana teve efeito positivo (β = 0,0002; IC 95% = 0,0001–0,0003), assim como a tendência temporal linear (β = 2,1100; IC 95% = 1,8261, 2,3939), indicando aumento da probabilidade de detecção ao longo dos anos. Além disso, a detecção variou entre os trimestres, sendo maior no terceiro trimestre em relação ao primeiro (β = 0,3030; IC 95% = 0,1530, 0,4531), enquanto o segundo trimestre não apresentou efeito consistente, pois seu intervalo de confiança sobrepôs-se a zero (β = -0,1301; IC 95% = -0,2845, 0,0242).

Para *M. semitorquatus*, a cobertura de núcleo florestal (β = 0,0254; IC 95% = 0,0130, 0,0379), a rugosidade (β = 0,0092; IC 95% = 0,0026, 0,0159), a elevação (β = 0,0003; IC 95% = 0,0000, 0,0006) e a altura do dossel (β = 0,1812; IC 95% = 0,1460, 0,2163) apresentaram efeito positivo sobre a probabilidade de ocupação (Fig. 2). Em contraste, o isolamento florestal (β = -0,0002; IC 95% = -0,0004, -0,0001) e o índice de integridade florestal (β = -0,1107; IC 95% = -0,1828, -0,0387) apresentaram efeito negativo sobre a ocupação da espécie (Fig. 2). Para a detecção, a densidade populacional humana apresentou efeito positivo (β = 0,0007; IC 95% = 0,0006, 0,0008), assim como a tendência temporal linear (β = 3,5142; IC 95% = 3,2365, 3,7919). A detecção também variou entre os trimestres, sendo maior no segundo (β = 0,2348; IC 95% = 0,1015, 0,3680) e no terceiro trimestre (β = 0,2105; IC 95% = 0,0770, 0,3440), enquanto o efeito do primeiro trimestre não foi consistente (β = -0,0391; IC 95% = -0,1761, 0,0979).

Nenhuma das variáveis analisadas apresentou efeito sobre a ocupação ou a detecção de *M. mintoni*. Os intervalos de confiança dos coeficientes β cruzaram o zero, não atendendo ao segundo critério de importância das variáveis. Esses resultados indicam que a variação na ocupação e na detecção da espécie não foi explicada pelas variáveis testadas.

Efeito da paisagem florestal

A cobertura de floresta nuclear apresentou efeito positivo sobre a ocupação de *M. semitorquatus* e *M. ruficollis*, evidenciando a importância das áreas interiores da floresta para esses predadores de topo. Na Mata Atlântica, a perda florestal intensa reduziu o tamanho dos remanescentes e aumentou a proporção de bordas, intensificando alterações microclimáticas e perturbações antrópicas (Ribeiro et al., 2009; Pinto et al., 2010). Como consequência, a disponibilidade de habitat interior tornou-se mais limitada. Assim, o efeito positivo observado indica que paisagens com maior cobertura de floresta nuclear oferecem

condições mais favoráveis para a permanência dessas espécies, provavelmente por concentrarem remanescentes maiores e menos impactos pela fragmentação e perda de habitat, capazes de sustentar populações de aves de rapina com grandes áreas de vida e baixa densidade populacional (Newton, 1979; Wilson et al., 2016).

A cobertura de floresta nuclear corresponde às porções interiores dos fragmentos, menos expostas aos efeitos de borda. Em paisagens com maior cobertura de núcleo, os remanescentes tendem a ser maiores e mais compactos, reduzindo a influência das bordas e preservando condições microclimáticas mais estáveis, como temperatura e umidade, além de maior complexidade estrutural da vegetação (Fischer & Lindenmayer, 2007; Fahrig, 2003). Essas características favorecem a manutenção da biodiversidade florestal e aumentam a disponibilidade de recursos essenciais, como presas e árvores de grande porte com cavidades naturais para nidificação. Para espécies do gênero *Micrastur*, que utilizam preferencialmente o sub-bosque e o interior de florestas para forrageamento e reprodução, a presença de extensas áreas de floresta nuclear representa um importante componente da qualidade da paisagem, proporcionando maior disponibilidade de habitat florestal e reduzindo a exposição aos efeitos de borda (Bierregaard, 1994; Fahrig, 2003).

A altura do dossel afetou positivamente a ocupação de *M. semitorquatus* e *M. ruficollis*, reforçando a importância da estrutura vertical da floresta para essas aves de rapina. Essa variável reflete a complexidade estrutural do habitat, o estágio sucessional da floresta e a disponibilidade de recursos para forrageamento, abrigo e reprodução (Ghadiri Khanaposhtani et al. 2012; Cockle et al. 2015). Florestas maduras, caracterizadas por dosséis mais altos, apresentam maior heterogeneidade estrutural, maior disponibilidade de presas e maior presença de cavidades naturais utilizadas para nidificação por espécies do gênero *Micrastur* (Lampila et al., 2005). A relevância dessa variável vai além das espécies analisadas neste estudo. Em escala global e regional, a altura média do dossel foi identificada como um dos principais preditores da riqueza de espécies e da diversidade funcional de mamíferos e aves (Feng et al. 2020). Esses resultados evidenciam que a complexidade da estrutura vertical da floresta exerce papel central na manutenção da biodiversidade de vertebrados terrestres (Feng et al. 2020). Assim, a redução de florestas com dosséis altos pode comprometer não apenas a disponibilidade de habitat, mas também os recursos específicos para a persistência de espécies florestais.

O isolamento florestal afetou negativamente a ocupação de *M. semitorquatus*, indicando que a conectividade entre manchas florestais é um fator determinante para a ocorrência da espécie na paisagem. Esse resultado corrobora estudos que demonstram que o aumento do isolamento entre manchas reduz a conectividade estrutural e funcional, atuando como um filtro ecológico que favorece espécies generalistas e tolerantes à matriz, enquanto restringe a permanência de espécies especialistas dependentes de florestas mais agregadas (Lees & Peres, 2008). Além de dificultar os deslocamentos entre manchas, matrizes antrópicas, como agropecuária e áreas urbanas, podem representar barreiras ao movimento de espécies com baixa tolerância a ambientes abertos, reduzindo o fluxo de indivíduos e, consequentemente, o fluxo

gênico entre populações (Cros et al. 2020). Dessa forma, esse processo tende a aumentar o isolamento populacional de *M. semitorquatus*, diminuindo a viabilidade demográfica e genética e elevando o risco de extinções locais na Mata Atlântica.

A integridade florestal apresentou efeito negativo sobre a ocupação de *M. semitorquatus*, indicando que a espécie não está restrita apenas às florestas mais conservadas. Esse resultado pode estar relacionado à maior plasticidade ecológica da espécie, permitindo a utilização de remanescentes florestais submetidos a diferentes níveis de perturbação e estágios sucessionais. Embora *M. semitorquatus* apresente preferência por florestas primárias, estudos demonstram que a espécie também utiliza florestas secundárias altas e bem preservadas, de acordo com sua disponibilidade na paisagem, onde forrageia e encontra recursos suficientes para sustentar suas populações (Martínez-Ruiz, 2021). Esse padrão sugere que, em paisagens com menor disponibilidade de florestas primárias, a espécie pode ocupar remanescentes secundários que ainda mantenham características estruturais adequadas à nidificação e à obtenção de recursos alimentares (Martínez-Ruiz, 2021).

Além dos efeitos diretos observados da cobertura de floresta nuclear, da altura do dossel e do isolamento florestal, a análise exploratória demonstrou que a cobertura florestal estava fortemente correlacionada a essas variáveis, indicando que esse atributo da paisagem também pode exercer influência indireta sobre a ocupação das espécies. Embora a cobertura florestal tenha sido removida da modelagem devido à colinearidade, sua correlação positiva com a cobertura de floresta nuclear e a altura do dossel, bem como a correlação negativa com o isolamento florestal, sugere que paisagens com maior quantidade de floresta também são importantes para a ocorrência de *M. ruficollis* e *M. semitorquatus*.

Efeito da topografia

As variáveis relacionadas ao relevo também podem influenciar a ocorrência das espécies ao modificar as condições microclimáticas do habitat, a estrutura da vegetação e a disponibilidade de recursos (Jucker et al. 2018; Muscarella et al. 2020). A heterogeneidade topográfica da Mata Atlântica favorece a formação de diferentes micro-habitats e contribui para a elevada biodiversidade do domínio (Ribon et al., 2021). Áreas com maior complexidade topográfica podem funcionar como refúgios para espécies sensíveis à perda de habitat, além de influenciar padrões regionais de distribuição e endemismo.

A rugosidade apresentou efeito positivo sobre a ocupação de *M. ruficollis* e *M. semitorquatus*, indicando que ambas as espécies tendem a ocorrer em paisagens caracterizadas por relevo mais acidentado, com maior presença de cumes, encostas e vales. A heterogeneidade topográfica aumenta a diversidade de condições ambientais, como maior disponibilidade de água, umidade e recursos, além da maior complexidade estrutural da vegetação, fatores que contribuem para o aumento da diversidade de aves florestais (Anjos et al., 2022; 2024). Em áreas montanhosas, os vales também atuam como ambientes mais úmidos e protegidos, sustentando maior disponibilidade de presas e maior diversidade de habitats quando comparados às encostas e aos topos de

montanha, que tendem a ser mais expostos às condições ambientais (Anjos et al., 2024). Dessa forma, paisagens com maior rugosidade podem oferecer condições mais favoráveis à ocupação de espécies do gênero *Micrastur*.

A elevação apresentou efeito positivo sobre a ocupação de *M. semitorquatus*, indicando maior ocorrência da espécie em áreas mais elevadas em relação ao nível do mar. Na Mata Atlântica, essas áreas geralmente apresentam maior cobertura de florestas contínuas, menor intensidade de perturbações antrópicas e maior complexidade estrutural da vegetação, características que favorecem a persistência de aves florestais (Ribon et al., 2021). Além disso, gradientes altitudinais estão associados a variações de temperatura, umidade e composição da vegetação, aumentando a heterogeneidade ambiental e a disponibilidade de presas ao longo da paisagem (Anjos et al., 2024). Assim, a preferência de *M. semitorquatus* por áreas mais elevadas pode refletir na maior disponibilidade de habitats florestais estruturalmente preservados, capazes de oferecer condições mais favoráveis e recursos para a manutenção de suas populações (Ribon et al., 2021).

Detecção das espécies e ciência cidadã

A crescente disponibilidade de dados provenientes de plataformas de ciência cidadã tem ampliado significativamente a capacidade de monitorar a distribuição geográfica das espécies e compreender suas respostas às mudanças ambientais. Plataformas como o eBird e o GBIF reúnem registros georreferenciados fornecidos por observadores da natureza e pesquisadores, possibilitando a construção de grandes bancos de dados que seriam inviáveis de serem obtidos por métodos tradicionais de amostragem em campo (Sullivan et al., 2014; Chandler et al., 2017). Para espécies raras, discretas, com grandes áreas de vida e baixa densidade populacional, como os falcões florestais do gênero *Micrastur*, esses bancos de dados representam uma importante fonte de informação para estudos ecológicos e para o planejamento de ações de conservação.

Entretanto, os dados provenientes da ciência cidadã apresentam limitações relacionadas à heterogeneidade do esforço amostral, à distribuição desigual dos observadores e à detecção imperfeita das espécies (Chandler et al., 2017; Johnston et al., 2020). Nesse contexto, a utilização de modelos de ocupação torna-se especialmente importante, pois permite incorporar explicitamente a probabilidade de detecção ao processo de modelagem, reduzindo vieses associados à ausência de registros em locais onde as espécies podem estar presentes (MacKenzie et al., 2003). Essa abordagem é particularmente relevante para o gênero *Micrastur*, cujas espécies apresentam comportamento discreto, baixa detectabilidade e utilizam preferencialmente o interior de florestas, características que dificultam sua amostragem por métodos convencionais.

Nesse estudo, a probabilidade de detecção de *M. ruficollis* e *M. semitorquatus* variou entre os trimestres e apresentou aumento linear ao longo dos anos. Esses padrões provavelmente refletem variações no esforço de observação ao longo do período amostral e o crescimento contínuo do número de observadores e de registros disponibilizados nas plataformas de ciência cidadã (Tubelis, 2023).

Além disso, a densidade populacional humana apresentou efeito positivo sobre a probabilidade de detecção dessas duas espécies, indicando que regiões densamente povoadas tendem a concentrar maior número de observadores e, consequentemente, maior probabilidade de registrar espécies na natureza (Sullivan et al., 2014; Chandler et al., 2017). Esse viés espacial é amplamente reconhecido em estudos baseados em ciência cidadã e sua incorporação como variável de detecção permitiu controlar parte dessa heterogeneidade do esforço amostral, resultando em estimativas mais robustas da probabilidade de ocupação das espécies (Johnston et al., 2020).

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que a ocupação de *M. ruficollis* e *M. semitorquatus* é influenciada principalmente por atributos relacionados à composição, à estrutura da paisagem florestal e à topografia. Isso evidencia que estratégias de conservação voltadas apenas para a quantidade de floresta remanescente podem ser insuficientes.

Nesse contexto, ações de conservação devem priorizar a proteção de grandes remanescentes florestais com elevada cobertura de floresta nuclear, com reduzido efeito de borda e com alta conectividade entre fragmentos, bem como incentivar a restauração de áreas degradadas capazes de ampliar a conectividade funcional. Essas medidas podem favorecer não apenas a ocupação das espécies de *Micrastur*, mas também a manutenção de processos ecológicos essenciais e da biodiversidade associada às florestas da Mata Atlântica (Fahrig, 2003; Fischer & Lindenmayer, 2007).

Referências

Alvares, CA, Stape, JL, Sentelhas, PC, Gonçalves, JDM, Sparovek, G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorol. Z., 22, 711-728

Amatulli, G, McInerney, D, Sethi, T, Strobl, P, Domisch, S (2020) Geomorpho90m, empirical evaluation and accuracy assessment of global high-resolution geomorphometric layers. Sci. Data, 7, 162

Bełcik, M, Lenda, M, Amano, T, Skórka, P (2020) Different response of the taxonomic, phylogenetic and functional diversity of birds to forest fragmentation. Sci. Rep., 10, 20320

Bierregaard Jr, RO (1998) Conservation status of birds of prey in the South American tropics. J. Raptor Res., 32, 19–27

BirdLife International (2024) *Micrastur mintoni*. The IUCN Red List of Threatened Species 2024: e.T22733700A231245006. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2024-2.RLTS.T22733700A231245006.en

Burnham, KP, Anderson, DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. Springer New York

Chandler, M, See, L, Copas, K, Bonde, AM, López, BC, Danielsen, F, et al. (2017). Contribution of citizen science towards international biodiversity monitoring. Biol. Conserv., 213, 280-294

CIESIN (2018) Gridded Population of the World, Version 4 (GPWv4): Population Density, Revision 11 (Version 4.11). Palisades: NASA Socioeconomic Data and Applications Center (SEDAC). https://doi.org/10.7927/H49C6VHW

Cockle, KL, Bodrati, A, Lammertink, M, Martin, K (2015) Cavity characteristics, but not habitat, influence nest survival of cavity-nesting birds along a gradient of human impact in the subtropical Atlantic Forest. Biol. Conserv. , 184, 193-200

Cros, E, Ng, EY, Oh, RR, Tang, Q, Benedick, S, Edwards, DP, et al. (2020) Fine-scale barriers to connectivity across a fragmented South-East Asian landscape in six songbird species. Evol. Appl., 13, 1026-1036

dos Anjos, L, Oliveira, HS, Willrich, G, Jardim, M, Rosa, GLM, de Araujo, CB (2022) Atlantic Forest birds are more functionally and taxonomically diverse in valley bottoms relative to uplands. Acta Oecol., 115, 103829

dos Anjos, L, Oliveira, HS, Lopes, EV, Medeiros, HR (2024) Valley bottoms increase bird species richness in Atlantic Forest fragments. Acta Oecol., 124, 104008

Fahrig, L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 34, 487-515

Feng, G, Zhang, J, Girardello, M, Pellissier, V, Svenning, JC (2020) Forest canopy height co-determines taxonomic and functional richness, but not functional dispersion of mammals and birds globally. Glob. Ecol. Biogeogr., 29, 1350-1359

Fick, SE, Hijmans, RJ (2017) WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. Int. J. Climatol., 37, 4302-4315

Fischer, J, Lindenmayer, DB (2007) Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. Glob. Ecol. Biogeogr., 16, 265-280

Ghadiri Khanaposhtani, M, Kaboli, M, Karami, M, Etemad, V (2012) Effect of habitat complexity on richness, abundance and distributional pattern of forest birds. Environ. Manage., 50, 296-303

Grantham, HS, Duncan, A, Evans, TD, Jones, KR, Beyer, HL, Schuster, R, et al. (2020) Anthropogenic modification of forests means only 40% of remaining forests have high ecosystem integrity. Nat. Commun., 11, 5978

Huais, PY, Osorio-Olvera, L, Cordier, JM, Tomba, AN, Soberón, J, Loyola, R, Nori, J (2025) Rethinking Global Hotspots for Threatened Terrestrial Vertebrates. Glob. Ecol. Biogeogr, 34: e13942

IBGE (2004) Mapa de vegetação do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBGE (2006) Mapa de unidades de relevo do Brasil. 2. ed. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Johnston, A, Moran, N, Musgrove, A, Fink, D, Baillie, SR (2020) Estimating species distributions from spatially biased citizen science data. Ecol. Model. 422, 108927.

Jucker, T, Bongalov, B, Burslem, DF, Nilus, R, Dalponte, M, Lewis, SL, et al. (2018) Topography shapes the structure, composition and function of tropical forest landscapes. Ecol. Lett., 21, 989-1000

Lampila, P, Mönkkönen, M, Desrochers, A (2005) Demographic responses by birds to forest fragmentation. Conserv. Biol., 19(5), 1537-1546

Lees, AC, Peres, CA (2008) Avian life-history determinants of local extinction risk in a hyper-fragmented neotropical forest landscape. Anim. Conserv., 11(2), 128-137

McClure, CJ, Westrip, JR, Johnson, JA, Schulwitz, SE, Virani, MZ, Davies, R, et al. (2018) State of the world's raptors: Distributions, threats, and conservation recommendations. Biol. Conserv., 227, 390-402

MacKenzie, DI, Nichols, JD, Hines, JE, Knutson, MG, Franklin, AB (2003) Estimating site occupancy, colonization, and local extinction when a species is detected imperfectly. Ecology, 84, 2200-2207

Martínez-Ruiz, M (2021) Habitat use and selection by the Collared Forest-Falcon (*Micrastur semitorquatus*) in the tropical rainforest of Los Tuxtlas Biosphere Reserve, Mexico. J. Raptor Res., 55, 201-210

Muscarella, R, Kolyaie, S, Morton, DC, Zimmerman, JK, Uriarte, M (2020) Effects of topography on tropical forest structure depend on climate context. J. Ecol., 108, 145-159

Muylaert, RL, Vancine, MH, Bernardo, R, Oshima, JEF, Sobral-Souza, T, Tonetti, VR, et al. (2018) Uma nota sobre os limites territoriais da Mata Atlântica. Oecol. Aust., 22, 302-311

Newton, I (1979) Population ecology of raptors. T & AD Poyser

O'Bryan, CJ, Allan, JR, Suarez-Castro, AF, Delsen, DM, Buij, R, McClure, CJ, et al. (2022) Human impacts on the world's raptors. Front. Ecol. Evol., 10, 624896

Pinto, SR, Mendes, G, Santos, AM, Dantas, M, Tabarelli, M, Melo, FP (2010) Landscape attributes drive complex spatial microclimate configuration of Brazilian Atlantic Forest fragments. Trop. Conserv. Sci., 3, 389-402

Potapov, P, Li, X, Hernandez-Serna, A, Tyukavina, A, Hansen, MC, Kommareddy, A, et al. (2021) Mapping global forest canopy height through integration of GEDI and Landsat data. Remote Sens. Environ., 253, 112165

QGIS Development Team (2026) QGIS geographic information system. QGIS Association. https://www.qgis.org

Ribeiro, MC, Metzger, JP, Martensen, AC, Ponzoni, FJ, Hirota, MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biol. Conserv., 142, 1141-1153

Ribon, R, dos Santos, LR, Júnior, PDM, Marini, MÂ (2021) Topography as a determinant of bird distribution in secondary Atlantic Forest fragments. J. Trop. Ecol., 37, 228-234

Rodrigues, RC, Hasui, É, Assis, JC, Pena, JCC, Muylaert, RL, Tonetti, VR, et al. (2019) ATLANTIC BIRD TRAITS: a data set of bird morphological traits from the Atlantic forests of South America. Ecology, 100, e02647

Souza Jr, CM, Z Shimbo, J, Rosa, MR, Parente, LL, A Alencar, A, Rudorff, BF, et al. (2020) Reconstructing three decades of land use and land cover changes in Brazilian biomes with Landsat archive and Earth Engine. Remote Sensing., 12, 2735

Sullivan, BL, Aycrigg, JL, Barry, JH, Bonney, RE, Bruns, N, Cooper, C B, et al. (2014). The eBird enterprise: An integrated approach to development and application of citizen science. Biol. Conserv., 169, 31-40

Tubelis, DP (2023) Spatiotemporal Distribution of Photographic Records of Brazilian Birds Available in the WikiAves Citizen Science Database. Birds, 4, 28-45

Wilson, MC, Chen, XY, Corlett, RT, Didham, RK, Ding, P, Holt, RD, et al. (2016) Habitat fragmentation and biodiversity conservation: key findings and future challenges. Landsc. Ecol., 31, 219-227

Winkler, DW, Billerman, SM, Lovette, IJ (2020). Falcons and Caracaras (Falconidae), version 1.0. In S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg (Eds.), Birds of the World. Cornell Lab of Ornithology

Anexos



Tabela 1 - Variáveis ambientais coletadas para estimar a probabilidade de ocupação (psi) e de detecção (rho) do falcão-relógio (Micrastur semitorquatus), do falcão-caburé (M. ruficollis) e do falcão-críptico (M. mintoni) na Mata Atlântica



Tabela 2 - Conjunto de modelos com suporte substancial da segunda etapa da modelagem de ocupação para estimar a probabilidade de ocupação (psi), de detecção (rho) e de extinção (epsilon) de Micrastur ruficollis, M. semitorquatus e M. mintoni



Tabela 3 - Peso cumulativo das variáveis da segunda etapa da modelagem de ocupação para estimar a probabilidade de ocupação (psi) e de detecção (rho) de Micrastur ruficollis, M. semitorquatus e M. mintoni



Figura 1 - Localização da área de estudo, apresentando (a) o limite integrativo, as células hexagonais de 0,5° x 0,5° utilizadas como unidades amostrais, e a extensão de ocorrência de (b) Micrastur ruficollis, (c) M. semitorquatus e (d) M. mintoni



Figura 2 - Efeitos das variáveis sobre a probabilidade de ocupação (ψ) ± intervalo de confiança de 95% do (a–c) falcão-caburé (Micrastur ruficollis) e do (d–h) falcão-relógio (M. semitorquatus) na Mata Atlântica

CÓDIGO: SB1470

AUTOR: MARIA LUIZA OLIVEIRA COELHO DE SOUZA

ORIENTADOR: ANA CAROLINA LUCHIARI

TÍTULO: EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DA N,N-DIMETILTRIPTAMINA (DMT) EM ESTÁGIOS INICIAIS DO ZEBRAFISH (Danio rerio)

Resumo

A N,N-dimetiltriptamina (DMT) é uma triptamina psicodélica com ação predominantemente serotoninérgica, cujo interesse farmacológico crescente reforça a necessidade de caracterizar seu perfil de segurança, especialmente durante fases iniciais do desenvolvimento. Neste estudo, avaliamos a embriotoxicidade aguda do fumarato de DMT em embriões de zebrafish (Danio rerio) expostos de 3 a 96 horas pós-fertilização (hpf) às concentrações de 10, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/L, seguindo a diretriz OECD 236. Foram avaliadas sobrevivência, eclosão, malformações e frequência cardíaca, além das estimativas de CL50, CL10 e Benchmark Dose (BMD). A sobrevivência foi reduzida nas maiores concentrações, com mortalidade acentuada em 150 e 200 mg/L. A eclosão foi retardada em 75, 100 e 150 mg/L. Não foram observadas malformações associadas à exposição ao DMT. A CL50 foi estimada em 119,6 mg/L, a CL10 em 60,62 mg/L e a BMD em 57,38 mg/L. A frequência cardíaca também foi alterada, com redução significativa em 10, 50 e 100 mg/L em relação ao controle. Os resultados indicam que o DMT apresenta embriotoxicidade dependente da concentração, caracterizada principalmente por redução da sobrevivência, atraso da eclosão e alterações da função cardíaca, sem evidência de teratogenicidade nas condições avaliadas.

Palavras-chave: N,N-dimetiltriptamina; DMT;embriotoxicidade;zebrafish;cardiotoxicidade

TITLE: Embryotoxic Effects of N,N-Dimethyltryptamine (DMT) in Early Developmental Stages of Zebrafish (Danio rerio)

Abstract

N,N-Dimethyltryptamine (DMT) is a psychedelic tryptamine with predominantly serotonergic action, whose growing pharmacological interest reinforces the need to

characterize its safety profile, especially during early stages of development. In this study, we evaluated the acute embryotoxicity of DMT fumarate in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed from 3 to 96 hours post-fertilization (hpf) to concentrations of 10, 50, 75, 100, 150, and 200 mg/L, following OECD Guideline 236. Survival, hatching, malformations, and heart rate were evaluated, in addition to estimates of LC50, LC10, and Benchmark Dose (BMD). Survival was reduced at the highest concentrations, with marked mortality at 150 and 200 mg/L. Hatching was delayed at 75, 100, and 150 mg/L. No malformations associated with DMT exposure were observed. The LC50 was estimated at 119.6 mg/L, the LC10 at 60.62 mg/L, and the BMD at 57.38 mg/L. Heart rate was also altered, with a significant reduction at 10, 50, and 100 mg/L compared with the control. The results indicate that DMT exhibits concentration-dependent embryotoxicity, characterized mainly by reduced survival, delayed hatching, and alterations in cardiac function, with no evidence of teratogenicity under the conditions evaluated.

Keywords: N,N-dimethyltryptamine; DMT; embryotoxicity; zebrafish; cardiotoxicity

Introdução

A N,N-dimetiltriptamina (DMT) é uma triptamina psicodélica de ocorrência natural, estruturalmente relacionada à serotonina e capaz de modular diferentes alvos serotoninérgicos, especialmente o receptor 5-HT2A, além de 5-HT1A, 5-HT2C e receptor sigma-1 (Carbonaro & Gatch, 2016). O crescente interesse farmacológico e clínico pela substância torna necessária a caracterização de seus efeitos tóxicos e de faixas de exposição biologicamente seguras.

A avaliação de toxicidade durante o desenvolvimento é particularmente relevante porque a exposição em estágios embrionários ocorre simultaneamente à formação e maturação de sistemas fisiológicos essenciais. Alterações nessa fase podem se manifestar como mortalidade, atraso de eclosão, malformações ou mudanças funcionais, incluindo efeitos cardiovasculares. Apesar do avanço dos estudos sobre os efeitos farmacológicos do DMT em adultos, ainda são limitadas as informações sobre seus efeitos em organismos em desenvolvimento.

O zebrafish (Danio *rerio*) é amplamente utilizado em estudos toxicológicos por apresentar desenvolvimento externo, rápida embriogênese, transparência nas fases iniciais e endpoints de desenvolvimento bem caracterizados (Scholz et al., 2008; MacRae & Peterson, 2015). A diretriz OECD 236 permite avaliar toxicidade aguda em embriões por meio de parâmetros de sobrevivência e desenvolvimento, possibilitando também a construção de curvas dose-resposta e a estimativa de concentrações de referência.

Diante disso, este estudo investigou os efeitos embriotóxicos do fumarato de DMT em embriões de zebrafish expostos por 96 horas. Foram avaliadas sobrevivência, eclosão, ocorrência de malformações e frequência cardíaca, além das estimativas da concentração letal para 50% (CL50) e 10% (CL10) dos organismos e da Benchmark Dose (BMD), com o objetivo de caracterizar o perfil dose-resposta da substância durante o desenvolvimento inicial.

Metodologia

Aprovação ética e diretrizes

Zebrafish machos e fêmeas (Danio rerio) da linhagem AB foram utilizados de acordo com a Resolução Normativa nº 34 do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Os procedimentos de manutenção e os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA, certificado institucional nº 358.036-2023) e seguiram as diretrizes da ARRIVE (https://arriveguidelines.org/). A saúde e o bem-estar dos animais foram monitorados diariamente durante todas as etapas experimentais.

Estratégia de estudo

Neste estudo, foram realizados ensaios de embriotoxicidade com fumarato de N,N-dimetiltriptamina (DMT), incluindo a avaliação de sobrevivência, eclosão, malformações e frequência cardíaca. A partir dos dados obtidos após 96 horas de exposição, foram estimadas as concentrações letais para 50% (CL50) e 10% (CL10) dos organismos e a Benchmark Dose (BMD). Para fins deste estudo, o termo DMT refere-se ao fumarato de N,N-dimetiltriptamina.

Manutenção de matrizes para reprodução

Foram utilizados zebrafish adultos (Danio rerio, linhagem AB, de ambos os sexos), mantidos no Fish Lab/UFRN exclusivamente para fins reprodutivos. Os animais foram alojados em sistema automatizado de recirculação (ZebTEC Active Blue Stand Alone – Tecniplast®), sob condições controladas de temperatura (27 ± 1 °C), pH (~7,2), amônia total (< 0,01 mg/L), condutividade (1300–1500 $\mu S.cm^{-1}$), oxigênio dissolvido (6,0 ± 0,1 mg/L) e fotoperíodo de 14 h claro/10 h escuro, com fase clara iniciando às 6h e encerrando às 20h.

A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com ração comercial flocada (Alcon Basic®, 45% de proteína e 5% de gordura; Alcon, Brasil) e náuplios de Artemia sp. (Artêmia Salina do RN, Brasil) com 24 h pós-eclosão, utilizados como alimento vivo.

Para obtenção dos embriões destinados às exposições, foram utilizados 15 peixes adultos da linhagem AB provenientes de três diferentes tanques reprodutivos, visando aumentar a heterogeneidade genética da prole. Os animais foram distribuídos em tanques de reprodução na proporção de três machos para duas fêmeas, contendo água do sistema de manutenção dos animais. Durante a noite, machos e fêmeas permaneceram fisicamente separados por uma divisória perfurada, permitindo apenas comunicação química por meio da troca de feromônios e visual.

Na manhã seguinte, a divisória foi removida na primeira hora do ciclo claro (6h00), permitindo a reprodução por período de 60 minutos. Esse procedimento possibilitou determinar com precisão a janela de fertilização dos ovos. Após o período reprodutivo, os ovos oriundos dos 3 tanques de reprodução foram coletados, analisados em

estereomicroscópio para verificação da viabilidade e transferidos para placas de Petri contendo água do sistema. Os embriões viáveis foram identificados pela ausência de coagulação e pela presença de formação de blástula em 3 horas pós-fertilização (hpf).

Exposição aguda ao DMT

O fumarato de N,N-dimetiltriptamina (DMT; fórmula empírica: $C_{16}H_{20}N_2O_4$; CAS No. 68677-26-9) foi adquirido comercialmente e diretamente dissolvido em água do sistema. Foram preparadas as concentrações de 10, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/L. A água do sistema foi utilizada como controle negativo e a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA; fórmula empírica: $C_6H_5Cl_2N$; CAS No. 95-76-1) a 4 mg/L como controle positivo.

Para cada tratamento, os embriões de zebrafish foram distribuídos em placas de poliestireno de 24 poços, contendo um embrião por poço, expostos continuamente por 96 horas sem troca do meio. Cada poço continha 2 mL da solução correspondente ao nível de tratamento, sendo quatro poços de cada placa destinados ao controle interno da placa contendo apenas água do sistema. Dessa forma, foi utilizado um tamanho amostral de 20 embriões para cada concentração em cada exposição. As placas foram mantidas em estufa a 27 °C durante todo o período experimental. O teste de embriotoxicidade foi realizado de acordo com a diretriz OECD 236.

Os embriões foram acompanhados desde 3 horas pós-fertilização (hpf) até 96 hpf. Às 24, 48, 72 e 96 hpf foram avaliados parâmetros de mortalidade, taxa de eclosão, malformações e ausência de batimentos cardíacos. As observações foram realizadas em estereomicroscópio (80×), e as alterações fenotípicas do desenvolvimento foram classificadas com base na descrição de Kimmel et al. (1995).

A concentração letal para 50% (CL50) e 10% (CL10) dos organismos foi estimada com base nos dados de mortalidade às 96 hpf. A Benchmark Dose (BMD) foi determinada a partir dos desfechos embrionários avaliados no modelo dose-resposta.

Cardiotoxicidade

A frequência cardíaca foi utilizada como parâmetro funcional em larvas de zebrafish com 96 hpf expostas ao DMT. Foram analisados até 20 indivíduos por grupo experimental e controle, de acordo com a sobrevivência disponível em cada concentração. As larvas foram observadas individualmente em placas de Petri contendo celulose para restringir os movimentos, sob estereomicroscópio com aumento de 80×. Os batimentos cardíacos foram contados durante 10 segundos e o valor foi multiplicado por seis para estimar batimentos por minuto (bpm). Para cada indivíduo, foram realizadas duas contagens consecutivas, e a média foi utilizada nas análises.

Análises estatísticas

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene). Para as curvas de sobrevivência e eclosão, utilizou-se o teste log-rank (Mantel-Cox). Os dados de embriotoxicidade foram analisados utilizando a plataforma Zebrafish Embryotoxicity Calculator. A modelagem dose-resposta foi realizada por regressão não linear log-logística no pacote drc do R, com seleção do modelo mais adequado (LL.2, LL.3 ou LL.4) pelo menor Critério de

Informação de Akaike (AIC). As concentrações letais/efetivas foram calculadas a partir do modelo ajustado, com intervalos de confiança e

Resultados e Discussões

Sobrevivência e eclosão

A exposição ao DMT produziu efeito significativo sobre a sobrevivência dos embriões (Log-rank, $p < 0,0001$). A mortalidade aumentou com a concentração, sendo mais acentuada a partir de 150 mg/L. Na concentração de 200 mg/L, ocorreu mortalidade total até 72 hpf, enquanto o controle em água manteve sobrevivência superior a 90% durante o período experimental (Figura 1a).

A taxa de eclosão também foi significativamente afetada pelo DMT (Log-rank, $p < 0,0001$). Os grupos de 10 e 50 mg/L apresentaram padrão semelhante ao controle, enquanto as concentrações de 75, 100 e 150 mg/L apresentaram atraso, com eclosão concluída apenas às 96 hpf. Em 200 mg/L não foi observada eclosão durante o período experimental, em associação à elevada mortalidade (Figura 1b).

Figura 1. Taxa de sobrevivência (a) e taxa de eclosão (b) de embriões de zebrafish (Danio rerio) após exposição aguda (96 h) ao DMT nas concentrações de 10, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/L. Água do sistema foi utilizada como controle negativo e 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA; 4 mg/L) como controle positivo. Os organismos foram avaliados a cada 24 h. Os dados foram analisados pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

Malformações

Não foram observadas malformações associadas à exposição ao DMT nas concentrações avaliadas.

Concentrações letais e Benchmark Dose

A partir dos dados obtidos às 96 hpf, a CL50 do DMT foi estimada em 119,6 mg/L e a CL10 em 60,62 mg/L. A Benchmark Dose (BMD) foi estimada em 57,38 mg/L (Figura 2).

Figura 2. Curvas dose-resposta do DMT após 96 horas de exposição. (a) Estimativas da concentração letal para 10% (CL10 = 60,62 mg/L) e 50% (CL50 = 119,6 mg/L) dos embriões. (b) Estimativa da Benchmark Dose (BMD = 57,38 mg/L). Foram avaliadas as concentrações de 10, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/L.

Cardiotoxicidade

A frequência cardíaca das larvas expostas ao DMT diferiu significativamente entre os grupos ($p < 0,001$). Em relação ao controle em água, foram observadas reduções significativas nas concentrações de 10 mg/L ($p = 0,0054$), 50 mg/L ($p = 0,0059$) e 100

mg/L ($p < 0,0001$). A concentração de 75 mg/L também diferiu de 100 mg/L ($p < 0,0001$), indicando uma resposta não monotônica entre as concentrações avaliadas (Figura 3).

Figura 3. Frequência cardíaca, expressa em batimentos por minuto (bpm), de larvas de zebrafish (Danio rerio) após exposição aguda (96 h) ao DMT. O gráfico apresenta o controle em água e as concentrações de 10, 50, 75 e 100 mg/L, para as quais havia organismos disponíveis para a avaliação. Diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$.

O presente estudo demonstrou que a exposição embrionária ao DMT produz efeitos dependentes da concentração sobre o desenvolvimento inicial do zebrafish. Os principais achados foram a redução da sobrevivência nas maiores concentrações, atraso da eclosão, ausência de malformações detectáveis e alterações da frequência cardíaca. A estimativa de CL50 em 119,6 mg/L e de BMD em 57,38 mg/L fornece parâmetros quantitativos para caracterizar a faixa de toxicidade da substância neste modelo.

O DMT é uma triptamina psicodélica com ação predominantemente serotoninérgica, especialmente por meio do receptor 5-HT2A, além de interagir com outros alvos serotoninérgicos e com o receptor sigma-1 (Carbonaro & Gatch, 2016). Durante a embriogênese, sistemas fisiológicos e neuromoduladores encontram-se em rápida organização, tornando essa janela particularmente sensível à exposição química (Quintaneiro et al., 2022; Shaw et al., 2016). Assim, alterações em sobrevivência, eclosão e função cardíaca constituem indicadores relevantes de toxicidade durante o desenvolvimento.

A toxicidade sobre a sobrevivência tornou-se evidente principalmente nas maiores concentrações. Em 200 mg/L, a mortalidade foi total até 72 hpf, enquanto concentrações mais baixas apresentaram maior sobrevivência. Esses resultados são coerentes com Oliveira et al. (2025), que não observaram aumento de mortalidade ou malformações em embriões expostos a concentrações muito inferiores de DMT (0,025 a 0,250 mg/L). Em conjunto, os dados sugerem que os efeitos letais dependem fortemente da faixa de concentração utilizada.

O atraso de eclosão observado em 75, 100 e 150 mg/L representa um efeito de desenvolvimento que ocorreu antes ou independentemente de alterações morfológicas evidentes. A ausência de malformações nas concentrações avaliadas indica que, nas condições deste estudo, os efeitos embriotóxicos do DMT se manifestaram principalmente por alterações de sobrevivência e do ritmo de desenvolvimento, e não por teratogenicidade detectável ao estereomicroscópio.

A CL10 de 60,62 mg/L e a BMD de 57,38 mg/L foram inferiores à CL50, como esperado para métricas voltadas à detecção de efeitos em níveis de exposição abaixo da mortalidade de metade da população. A modelagem por BMD é particularmente útil por utilizar a relação dose-resposta para estabelecer um ponto de referência toxicológico, reduzindo a dependência de uma única concentração experimental (De Pretis et al., 2024).

Além dos efeitos sobre sobrevivência e eclosão, a exposição ao DMT alterou a frequência cardíaca em 96 hpf, com redução significativa em 10, 50 e 100 mg/L. Oliveira et al. (2025) não observaram alterações cardíacas em concentrações entre 0,025 e 0,25 mg/L, indicando que a resposta pode depender da dose e do estágio avaliado. Em humanos

adultos, por outro lado, a administração aguda de DMT foi associada a aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Strassman et al., 1994; D'Souza et al., 2022). As diferenças entre esses resultados ressaltam a importância do estágio de desenvolvimento, da espécie e da via de exposição na interpretação dos efeitos cardiovasculares.

Como limitações, este estudo avaliou apenas fases iniciais do desenvolvimento e não incluiu análises moleculares, bioquímicas ou histológicas capazes de identificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados. Também foram utilizadas concentrações amplas para caracterização da curva dose-resposta, incluindo níveis muito superiores aos empregados em estudos farmacológicos. Estudos futuros com faixas subletais mais estreitas e marcadores mecanísticos poderão esclarecer a relevância biológica das alterações de eclosão e frequência cardíaca e determinar se esses efeitos persistem em fases posteriores do desenvolvimento.

Conclusão

A exposição embrionária ao DMT apresentou toxicidade dependente da concentração em zebrafish, caracterizada por redução da sobrevivência em concentrações elevadas, atraso da eclosão e alterações da frequência cardíaca, sem malformações detectáveis. A CL50 de 119,6 mg/L, a CL10 de 60,62 mg/L e a BMD de 57,38 mg/L delimitam a resposta dose-dependente observada e fornecem parâmetros iniciais para estudos de segurança do DMT durante o desenvolvimento.

Referências

• Carbonaro TM, Gatch MB. Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. Brain Res Bull. 2016 Sep;126(Pt 1):74-88. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.016. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27126737; PMCID: PMC5048497.

• De Pretis F, Zhou Y, Xun P, Shao K. Benchmark dose modeling for epidemiological dose-response assessment using prospective cohort studies. Risk Anal. 2024 Apr;44(4):743-756. doi: 10.1111/risa.14196. Epub 2023 Jul 27. PMID: 37496455; PMCID: PMC10817999.

• D'Souza DC et al. Exploratory study of dose-related safety of DMT in volunteers and MDD patients. Neuropsychopharmacology. 2022.

• Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203(3), 253–310.

• MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery, 14(10), 721–731.

• OECD. (1992). Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test No. 236.

• Oliveira, A.; Oliveira, D. de; Santos, R. dos; Hallak, J. P28-25 DMT as a potential anxiolytic: effects on zebrafish (Danio rerio) embryo-larvae development and behavior. Toxicology Letters, Amsterdam, v. 412, Suppl. 1, p. S113-S114, 2025. DOI: 10.1016/j.toxlet.2025.07.830.

• Quintaneiro, C., Gagliardi, M., Capone, L., & Domingues, I. (2022). Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (Danio rerio). Revista Brasileira de Biociências, 11, Art. 8.

• Scholz, S.; Fischer, S.; Gündel, U.; Küster, E.; Luckenbach, T.; Voelker, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environmental Science and Pollution Research, v. 15, n. 5, p. 394–404, 2008.

• Shaw, B.J.; Liddle, C.C.; Windeatt, K.M.; Handy, R.D. A critical evaluation of the fish early-life stage toxicity test for engineered nanomaterials: Experimental modifications and recommendations. Arch. Toxicol. 2016, 90, 2077–2107

• Strassman RJ et al. Dose–response study of N,N-dimethyltryptamine in humans. I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. JAMA Psychiatry. 1994;51(2):85–97.

Anexos



sobrevivencia e eclosao



cardio toxicidade



Concentrações letais e Benchmark Dose

CÓDIGO: SB1499

AUTOR: MARIA LUIZA SOARES GREGORIO

ORIENTADOR: LEONARDO DE MELO VERSIEUX

TÍTULO: A ordem Poales no RN: riqueza, endemismo e estudos taxonômicos

Resumo

A ordem Poales reúne elevada diversidade de espécies e famílias de grande importância ecológica, econômica e cultural, porém sua composição no Rio Grande do Norte é ainda subavaliada. Este projeto teve como objetivo realizar um levantamento das espécies de Poales ocorrentes no estado, atualizando informações sobre riqueza, composição, novas ocorrências, endemismo e conservação. Foram consultados registros de coleções científicas e bases de dados virtuais, incluindo os herbários UFRN, MOSS e RN, além das plataformas SpeciesLink, JABOT e REFLORA e de bibliografia especializada. Foram registradas 341 espécies, distribuídas em 99 gêneros em sete famílias, com maior riqueza em Poaceae (181 espécies / 70 gêneros), Cyperaceae (103/11) e Bromeliaceae (34/10), concentrando 93,3% das espécies levantadas. Também foram identificadas 71 novas ocorrências para o estado, com destaque para Poaceae, que apresentou 42 novas ocorrências. Além disso, foram obtidos dados de espécies endêmicas do Brasil e táxons classificados em categorias de conservação, incluindo espécies vulneráveis, além de espécies naturalizadas e cultivadas. Os resultados evidenciam a importância da integração de coleções botânicas, bases de dados e literatura especializada para a atualização do conhecimento sobre a flora estadual e reforçam a necessidade da continuidade dos levantamentos florísticos e da atualização dos acervos para subsidiar pesquisas e estratégias de conservação.

Palavras-chave: Conservação; Flora; Poales; Rio Grande do Norte

TITLE: The order Poales in RN: richness, endemism, and taxonomic studies

Abstract

The order Poales encompasses a high diversity of species and groups of great ecological, economic, and cultural importance; however, knowledge of its composition in the state of Rio Grande do Norte remains incomplete. This study aimed to survey the Poales species occurring in the state, updating information on species richness, composition, new occurrences, endemism, and conservation status. Records from scientific collections and virtual databases were consulted, including the UFRN, MOSS, and RN herbaria, as well as the SpeciesLink, JABOT, and REFLORA platforms and specialized literature. A total of 341 species were recorded, distributed among 99 genera and seven families. The highest richness was found in Poaceae (181 species / 70 genera), Cyperaceae (103/11),

and Bromeliaceae (34/10), which together accounted for 93.3% of the surveyed species. Additionally, 71 new occurrences for the state were identified, with Poaceae accounting for 42 of these new occurrences. Data were also compiled on species endemic to Brazil and taxa classified under conservation categories, including vulnerable species, as well as naturalized and cultivated species. The results highlight the importance of integrating botanical collections, databases, and specialized literature to update knowledge of the state's flora and reinforce the need for continued floristic surveys and the updating of botanical collections to support research and conservation strategies.

Keywords: Conservation; Flora; Poales; Rio Grande do Norte

Introdução

As monocotiledôneas constituem um grupo monofilético dentro das angiospermas, considerado como uma das principais linhagens de plantas com flores por corresponderem a cerca de 20% a 25% de toda a diversidade de angiospermas no planeta. Esse é um táxon caracterizado principalmente pela presença de folhas com nervação tipicamente paralela, peças florais trímeras, feixes vasculares dispersos no caule, ausência de crescimento secundário vascular típico e presença de um sistema radicular predominantemente adventício. Atualmente, este grupo compreende cerca de 12 ordens distribuídas em 77 famílias, que reúnem espécies de grande relevância ecológica e econômica, fundamentais para a estabilidade dos ecossistemas e para a sobrevivência humana (Chase, 2004; Remizowa, Graham, Rudall, 2022; Humphreys; Howard; Tribble, 2026).

Dentro dessa diversidade, a ordem Poales destaca-se pela sua riqueza, concentrando aproximadamente 7% da diversidade de angiospermas e cerca de um terço das espécies de monocotiledôneas (Givnish et al. 2010). Entre seus representantes, a ordem reúne grupos de ampla distribuição e diferentes estratégias de ocupação territorial, incluindo espécies adaptadas a condições bastante distintas, que variam desde as florestas tropicais a zonas áridas temperadas, concentrando plantas de grande importância econômica, ecológica e cultural, especialmente aquelas pertencentes à família Poaceae, muito presentes em monoculturas como do arroz, milho e trigo. Além disso, a ordem Poales engloba famílias amplamente utilizadas no paisagismo e que desempenham funções relevantes nos ecossistemas, como Bromeliaceae.

No Brasil, estima-se que Poales englobem aproximadamente 4.400 espécies (Flora e Funga do Brasil 2025). Apesar de dominarem vegetações abertas tradicionalmente associadas ao Cerrado e aos Pampas, uma grande riqueza de espécies deste grupo ocorre nas formações secas da região Nordeste do país, como também nas florestas atlânticas de seu litoral, mas ainda pouco documentada. No Rio Grande do Norte (RN), há listadas cerca de 300 espécies pertencentes às famílias da ordem Poales, porém, atualmente, o estado é marcado pelo título de menor riqueza de angiospermas em território nacional (BFG 2015), indicando que o conhecimento destas famílias pode estar subestimado, uma vez que o número de novas ocorrências e espécies novas de plantas para a ciência no RN vem evidenciando esse fato (Magalhães et al. 2014; São-Mateus et al. 2013; Soares et al. 2017, 2023; Tomaz & Versieux 2019; Versieux et al. 2013a, 2013b).

Além disso, para Poales, dados sobre taxonomia e diversidade de espécies é ainda considerado muito escasso, excetuando-se os artigos de Ferreira et al. (2009), que listou as espécies de Poaceae para a Estação Ecológica do Seridó; Oliveira et al. (2009), que realizou o tratamento taxonômico para o gênero Paspalum no Rio Grande do Norte; e Tomaz & Versieux (2019), que também realizou um tratamento taxonômico para a família Bromeliaceae para o estado. A partir disso, o RN tem mostrado um grande potencial de abrigar espécies novas da ordem, evidenciado pelas contribuições de Ribeiro et al. (2015), Cavalcante & Silva (2021) e Leme et al. (2025).

Diante o exposto, este projeto objetiva inventariar as espécies pertencentes à Poales ocorrentes no estado do RN, atualizando o estado da arte e o levantamento da riqueza de espécies, endemismos, bem como as listas de espécies consideradas prioritárias para a conservação dentro da ordem. Assim, auxiliando em rede o projeto de Poales Nordestinas da Universidade Estadual de Feira de Santana, na Bahia.

Metodologia

Para o levantamento de dados referente às espécies de Poales ocorrentes no Rio Grande do Norte (RN), foram consultados registros provenientes de coleções científicas e bases de dados de acesso virtual. Inicialmente, foi consultado o Herbário UFRN, pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), por constituir uma das principais coleções de referência para a flora do estado. Além desta, foram consultadas as coleções dos herbários MOSS, da Universidade Federal do Semi-Árido, e RN, localizado no Parque Estadual Dunas do Natal - Jornalista Luiz Maria Alves. O acesso aos registros dessas coleções foi realizado virtualmente, por meio das plataformas *SpeciesLink*, JABOT e do Flora e Funga do Brasil (REFLORA), considerando as informações disponibilizadas para as amostras e, quando disponíveis, imagens de alta resolução.

A partir dos registos obtidos, foram levantadas as espécies pertencentes à ordem Poales com ocorrência registrada para o RN, contabilizando informações referentes às famílias Poaceae Barnhart, Cyperaceae A.Juss., Bromeliaceae A.Juss., Eriocaulaceae Martinov, Xyridaceae C.Agardh, Mayacaceae Kunth e Typhaceae A.Juss., de acordo com levantamento realizado. A partir daí, os dados foram organizados em planilhas, nas quais foram compiladas informações referentes à família, gênero e espécie, bem como aos registros considerados novas ocorrências para o estado, comparando com a base de dados da Flora e Funga do Brasil. Também foram identificados registros que demandam confirmação taxonômica, sendo classificados como possíveis ocorrências conforme critérios adotados durante a análise.

Para a complementação e conferência das informações taxonômicas e de distribuição, foram consultadas bibliografias especializadas referentes aos grupos estudados, priorizando artigos científicos, livros, capítulos de livros e trabalhos voltados à flora brasileira. As informações de conservação foram obtidas a partir dos dados disponibilizados pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora), considerando as categorias de risco atribuídas às espécies avaliadas. Também foram

compiladas informações referentes ao endemismo, considerando a distribuição das espécies no território brasileiro, e à condição de espécies naturalizadas ou cultivadas, quando essas informações estavam disponíveis nos registros e fontes consultadas.

Após a compilação, os dados foram sistematizados por família e gênero, permitindo a quantificação da riqueza de espécies, ou seja, o valor total de diferentes espécies que fazem parte de cada família e estão concentradas em um mesmo ambiente, bem como a identificação dos grupos mais representativos. Foram ainda contabilizados os registros classificados como novas ocorrências e possíveis ocorrências para o estado, as espécies com endemismo, as categorias de conservação e os registros de espécies naturalizadas e cultivadas. A partir desses dados, foram realizadas análises descritivas da composição e da representatividade das famílias e gêneros de Poales no Rio Grande do Norte.

Resultados e Discussões

Diversidade e composição das Poales no Rio Grande do Norte

Ao final do levantamento, foram registradas 341 espécies de Poales, distribuídas em 99 gêneros e sete famílias no Rio Grande do Norte. Entre os números obtidos, a maior riqueza foi observada na família Poaceae, com 181 espécies distribuídas em 70 gêneros, seguida por Cyperaceae, com 103 espécies e 11 gêneros, e Bromeliaceae, com 34 espécies distribuídas em 10 gêneros. Em conjunto, essas três famílias concentraram 318 espécies, correspondendo a aproximadamente 93,3% das espécies registradas. As demais famílias registradas apresentaram menor riqueza, com 14 espécies em Eriocaulaceae, cinco em Xyridaceae, três em Mayacaceae e apenas uma em Typhaceae, a *Typha domingensis* Pers.

Entre os gêneros registrados, Cyperus L., pertencente à família Cyperaceae, apresentou a maior riqueza da ordem, com 43 espécies, seguido por *Paspalum* L., da família Poaceae, com 23 espécies. Além dos gêneros citados, a família Poaceae também obteve como destaque *Digitaria* Haller, com 12 espécies, *Eragrostis* Wolf e *Panicum* L., com 11 e dez espécies, respectivamente cada, e *Urochloa* P.Beauv., com oito espécies. Já em Cyperaceae, após *Cyperus*, os gêneros *Rhynchospora* Vahl e *Eleocharis* R.Br. apresentaram 21 e 12 espécies, respectivamente, seguidos por *Scleria* P.J.Bergius, com oito, e *Bulbostylis* Kunth, com sete espécies. Em Bromeliaceae, por sua vez, foi apontado como mais representativo o gênero *Tillandsia* L., com um total de 12 espécies registradas, seguido por *Hohenbergia* Schult. & Schult.f. e *Aechmea* Ruiz & Pav., com seis espécies. Quanto à família Eriocaulaceae, sua riqueza no estado do Rio Grande do Norte foi melhor demonstrada a partir dos gêneros *Giuliettia* Andrino & Sano, *Paepalanthus* Mart. e *Syngonanthus* Ruhland, com quatro espécies cada.

A partir das análises, a distribuição da riqueza evidencia uma concentração expressiva das espécies em Poaceae, Cyperaceae e Bromeliaceae. Poaceae, isoladamente, correspondeu a aproximadamente 53,1% das espécies levantadas, enquanto Cyperaceae representou cerca de 30,2%. Dessa forma, essas duas famílias, em conjunto, concentraram

aproximadamente 83,3% das espécies registradas, demonstrando que a riqueza das Poales no Rio Grande do Norte está fortemente concentrada em poucos grupos taxonômicos. Essa concentração também é observada na distribuição dos gêneros, uma vez que *Cyperus* e *Paspalum* foram os gêneros mais ricos do levantamento, reforçando a contribuição de Cyperaceae e Poaceae para a composição das Poales no estado. Ambas as famílias são bem distribuídas nos dois biomas do estado, e apresentam adaptações tanto para ambientes mais úmidos ou alagados, mas também em ambientes secos.

Novas ocorrências, endemismo e conservação

A elevada riqueza registrada foi acompanhada por um número expressivo de novas ocorrências para o estado. A partir da comparação com os registros disponíveis no Flora e Funga do Brasil (REFLORA), foram identificadas 71 novas ocorrências para o Rio Grande do Norte, distribuídas entre quatro das sete famílias analisadas. Poaceae concentrou novamente o maior número, com 42 novas ocorrências, seguida por Cyperaceae, com 15, e por Bromeliaceae e Eriocaulaceae, com sete ocorrências cada. Não foram identificadas novas ocorrências nas famílias Mayacaceae, Typhaceae e Xyridaceae. Além das novas ocorrências, foram registradas possíveis ocorrências em Cyperaceae e Poaceae, correspondendo a quatro e sete registros, respectivamente, conforme os critérios adotados na análise.

O número de novas ocorrências identificado é particularmente relevante por representar uma parcela expressiva do conjunto analisado. Embora Poaceae tenha concentrado o maior número absoluto de novas ocorrências, Eriocaulaceae apresentou uma proporção elevada em relação à sua riqueza total, uma vez que sete das 14 espécies registradas correspondem a novas ocorrências. Esse resultado evidencia que a ampliação de levantamentos e a consolidação de registros provenientes de diferentes bases de dados podem contribuir significativamente para o conhecimento da composição florística do estado.

Em relação ao endemismo, foram registradas espécies endêmicas do Brasil em cinco das sete famílias analisadas. Bromeliaceae apresentou o maior número absoluto de espécies endêmicas, com 18 registros, seguida por Poaceae, com 10, Cyperaceae, com oito, e Eriocaulaceae, com sete. Xyridaceae apresentou somente uma espécie endêmica, *Xyris moraesii* L.B.Sm. & Downs, enquanto não foram identificadas espécies endêmicas nas famílias Mayacaceae e Typhaceae.

Nesse sentido, embora Poaceae apresente a maior riqueza absoluta entre as famílias analisadas, Bromeliaceae e Eriocaulaceae destacaram-se proporcionalmente quanto ao endemismo, com 52,9% e 50% de suas espécies, respectivamente, apresentando distribuição endêmica no Brasil. Visto que, em Bromeliaceae, mais da metade das espécies registradas apresentou distribuição endêmica no Brasil, enquanto que em Eriocaulaceae essa proporção correspondeu à metade da riqueza registrada. Esse contraste evidencia que a importância florística das famílias não está relacionada exclusivamente ao número total de espécies, isto é, à riqueza absoluta, mas também à presença de táxons com distribuição restrita.

Quanto ao status de conservação, foi possível encontrar registros de espécies classificadas pelo CNCFlora nas categorias Pouco Preocupante (LC) e Vulnerável (VU), além de espécies indicadas como Não Avaliadas (NE) ou com Dados Insuficientes para avaliação (DD). A maior parte dos registros analisados, entretanto, não apresentou avaliação de conservação nas bases de dados consultadas. Ainda assim, entre as espécies avaliadas, Bromeliaceae, apresentou 13 espécies classificadas como LC e uma espécie, *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis., classificada como VU. Em Cyperaceae e Poaceae, duas e 11 espécies, respectivamente, foram classificadas como LC.

Importante ressaltar que a ocorrência de espécies classificadas em categorias de ameaça é o que reforça a importância de levantamentos florísticos para a identificação de elementos que podem demandar atenção em estratégias de conservação. Entretanto, o elevado número de espécies sem avaliação também evidencia uma lacuna na disponibilidade de informações sobre o estado de conservação dos táxons registrados, não devendo a ausência de avaliação ser interpretada como ausência de risco.

Espécies naturalizadas e cultivadas

Entre as espécies registradas, também foram identificadas espécies classificadas como naturalizadas e cultivadas. Poaceae, novamente, apresentou a maior quantidade desses registros, com 49 espécies naturalizadas e duas cultivadas, enquanto Cyperaceae apresentou quatro espécies naturalizadas e uma cultivada. Nas demais famílias, não foram identificados registros dessas categorias nos bancos de dados consultados.

Apesar disso, há de se levar em consideração que, a concentração de espécies naturalizadas em Poaceae acompanha sua elevada riqueza no estado, uma vez que a família apresentou tanto o maior número total de espécies, quanto o maior número absoluto de espécies naturalizadas. Esse padrão também pode estar relacionado à ampla utilização de representantes da família em atividades agrícolas, pecuárias e ornamentais, embora essa relação não possa ser obtida diretamente e apenas a partir dos dados obtidos. Assim, a presença dessas espécies naturalizadas evidencia, ainda, a influência das atividades humanas sobre a composição da flora registrada, especialmente em ambientes sujeitos a alterações antrópicas. Entretanto, é importante lembrar que, a condição de espécie naturalizada não implica necessariamente comportamento invasor, sendo necessária a distinção entre naturalização e invasão biológica para a avaliação de seus possíveis impactos ecológicos.

Conclusão

O levantamento das Poales ocorrentes no Rio Grande do Norte registrou 341 espécies, distribuídas em 99 gêneros e sete famílias, ampliando o conhecimento sobre a diversidade da ordem no estado em relação aos registros anteriormente disponíveis. A riqueza apresentou distribuição desigual entre as famílias, com destaque para Poaceae e Cyperaceae, que concentraram a maior parte das espécies registradas. Poaceae destacou-

se ainda pelo maior número de novas ocorrências, reforçando sua expressiva contribuição para a composição das Poales no estado.

A identificação de 71 novas ocorrências, além de possíveis novos registros, demonstra que o conhecimento sobre a composição das Poales no Rio Grande do Norte ainda pode ser ampliado a partir da integração de coleções científicas, bases de dados e literatura especializada. Nesse contexto, os resultados reforçam a importância da manutenção, digitalização e atualização dos acervos botânicos como fontes fundamentais para o conhecimento da distribuição das espécies.

Sob a perspectiva da conservação, Bromeliaceae apresenta especial relevância, destacando-se pela maior quantidade absoluta e elevada proporção de espécies endêmicas do Brasil, enquanto Eriocaulaceae também apresentou elevada representatividade proporcional de endemismo. A ocorrência de espécies classificadas em categorias de ameaça, associada à existência de diversos táxons ainda sem avaliação de conservação, evidencia a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a distribuição e o status de conservação das espécies de Poales no estado.

Além de sua importância florística e ecológica, as Poales incluem grupos de reconhecida relevância alimentar, econômica, ornamental e forrageira, especialmente entre as Poaceae, enquanto outras famílias apresentam importância ecológica e paisagística. Assim, o conhecimento da composição e distribuição dessas espécies constitui uma base para estudos taxonômicos, biogeográficos e ecológicos, bem como para o planejamento de estratégias de conservação da flora potiguar.

Recomenda-se a continuidade dos levantamentos florísticos e da atualização dos registros em coleções botânicas, com atenção especial às espécies identificadas como novas ocorrências, aos táxons endêmicos e àqueles ainda não avaliados quanto ao seu status de conservação. Assim, a ampliação desses esforços poderá contribuir para o refinamento do conhecimento sobre as Poales no Rio Grande do Norte e subsidiar futuras ações de conservação, manejo e pesquisa da flora estadual.

Referências

BFG – The Brazilian Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. Rodriguésia 66(4): 1085–1113.

BFG – The Brazilian Flora Group. 2015. Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). Rodriguésia 69: 1513–1527.

Cavalcante, B.P. & Silva, M.F. 2021. Hohenbergia densa (Bromeliaceae), a new species from Rio Grande do Norte, Brazil. Phytotaxa 520: 203–208.

Chase, M. W., and Reveal, J. L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. Botanical Journal of Linnean Society 161: 122–127.

CHASE, Mark W. Monocot relationships: an overview. American Journal of Botany, v. 91, n. 10, p. 1645–1655, out. 2004.

Ferreira, C.G., Oiveira, R.C., Valls, J.F.M. & Loiola, I.B. 2009. Poaceae da Estação Ecológica do Seridó, Rio Grande do Norte, Brasil. Rodriguésia Hoehnea 36: 679–707.

Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < http://floradobrasil.jbrj.gov.br/ >. Acesso em: 13 Jun 2025

Givnish T., Ames, M., McNeal, J., McKain, M., Steele, P., de Pamphilis, C., Graham, S., Pires, J., Stevenson, D., Zomlefer, W., Briggs, B., Duvall, M., Moore, M., Heaney, J., Soltis, D., Soltis, P., Thiele, K. & Leebens-Mack, J. (2010). Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. Annales of the Missouri Botanical Garden 97: 584–616.

Givnish, T. J., Zuluaga, A., Spalink, D., Soto Gomez, M., Lam, V. K. Y., Saarela, J. M., et al. (2018). Monocot plastid phylogenomics, timeline, net rates of species diversification, the power of multi-gene analyses, and a functional model for the origin of monocots. American journal of Botany 105: 1888–1910.

Leme, E.M.C., Souza, E.H., Till, W., Barfuss, M.H.J., Filho, J.A.S., Kollmann, L.J., Couto, D.R., Fraga, C.N.D., Fontana, A.P., Farias-Castro, A.S. & Silva, J.B.F.D. 2025. Twenty Miscellaneous New Species and One New Nothogenus and Nothospecies in Brazilian Bromeliaceae. Phytotaxa 692 (1): 1–60.

Lughadha, E. N., Govaerts, R., Belyaeva, I., Black, N., Lindon, H., Allkin, R., Magill, R.R. & Nicolson, N. (2016). Counting counts: Revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. Phytotaxa 272 (1), 82–88.

Magalhães R, Versieux LM, Calvente A (2014) Aechmea muricata (Arruda) L.B. Sm. (Bromeliaceae: Bromelioideae): A new record of a threatened species for Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. Check List 10(2): 434–435.

Oliveira, R.C., Santana, S.H., Silva, A.S., Maciel, J.R. & Valls, J.F.M. 2009. Paspalum (Poaceae) no Rio Grande do Norte, Brasil. Rodriguésia 64: 847–862.

REMIZOWA, Margarita V.; GRAHAM, Sean W.; RUDALL, Paula J. Editorial: Monocot phylogenetics and trait evolution. Frontiers in Plant Science, v. 13, 10 nov. 2022.

Ribeiro, A.R.O., Alves, M. & Oliveira, R.C. 2015. A new species of Cyperus L. (Cyperaceae) from northeastern Brazil. Phytotaxa 204 153–158.

São-Mateus, W.M.B., Cardoso, D.B.O.S., Jardim, J.G., Queiroz, L.P. 2013. Papilionoideae (Leguminosae) in the Atlantic Forest of Rio Grande do Norte, Brazil. Biota Neotropica 13: 315–362.

Silva, G.L., Roque, A.A., Queiroz, R.T. & Mezzonato-Pires, A.C. 2024. Passiflora natalensis, a new species of Passiflora (Passifloraceae sensu stricto) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil. Acta Botanica Brasilica 38: e20230282

Soares, A.S., Pastore, J.F.B. & Jardim, J.G. 2017. New records, conservation assessments and distribution of Lamiaceae in Rio Grande do Norte, northeastern, Brazil. Phytotaxa 311: 43-56.

Soares, A.S., Harley, R.M., Antar, G.M. & Pastore, J.F.B. 2023. Marsypianthes dunensis, a new species of Hyptidinae (Lamiaceae) from Brazilian coastal vegetation. Kew Bulletin 78: 319–325.

Tomaz, E.C. & Versieux, L.M. 2019. Bromeliaceae from Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. Phytotaxa 422: 113– 43.

Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S., et al. (2009). Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 12377–12381.

CÓDIGO: SB1508

AUTOR: MATHEUS HOLANDA SILVA

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Distribuição espaço-temporal da fauna acompanhante capturada na pesca de grandes pelágicos no oceano Atlântico Sul

Resumo

A pesca de grandes pelágicos possui elevada relevância econômica e alimentar, mas também está associada à captura incidental de espécies não alvo. Este estudo avaliou a dinâmica espaço-temporal da fauna acompanhante, i.e. bycatch, capturada pela pesca de espinhel no Atlântico Sul entre 1980 e 2016. Foram analisados um total de 87.421 operações de pesca, os quais reuniram 22 grupos taxonômicos de bycatch. As capturas mostraram elevada heterogeneidade temporal e espacial, com predominância de poucas categorias e espécies e maior contribuição das frotas brasileira e espanhola para a captura incidental. A expansão da atividade pesqueira a partir da década de 1990 coincidiu com o aumento da captura incidental total e com a ampliação da área explorada, que atingiu seu máximo nos anos 2000, seguida por retração na década de 2010. Em escala mensal, as maiores taxas de bycatch foram observadas entre setembro e dezembro, sobretudo no sudoeste do Atlântico Sul. Os resultados indicam que a dinâmica da captura incidental resulta da interação entre atividade pesqueira e, possivelmente, também à heterogeneidade ambiental. A próxima etapa integrará variáveis oceanográficas em Modelos de Distribuição de Espécies para identificar áreas de maior risco e subsidiar estratégias de manejo espacial.

Palavras-chave: Gestão pesqueira; Hotspot; Pesca de espinhel; SDMs

TITLE: Spatio-temporal distribution of bycatch captured in large pelagic fisheries in the South Atlantic Ocean

Abstract

Large pelagic fisheries have high economic and food-security importance, but are also associated with the incidental capture of non-target species. This study evaluated the spatio-temporal dynamics of bycatch in pelagic longline fisheries in the South Atlantic Ocean between 1980 and 2016. A total of 87,421 fishing operations were analyzed, which yielded 22 taxonomic groups classified as incidental catch (i.e., bycatch). Overall, bycatch showed high temporal and spatial heterogeneity, with catches clustered in a few taxonomic categories, and with the Brazilian and Spanish fleets making the largest contributions to incidental catches. The expansion of fishing activity from the

1990s coincided with increased total bycatch and expansion of the exploited area, which reached its maximum in the 2000s and contracted in the 2010s. Higher bycatch rates occurred from September to December, mainly in the southwestern South Atlantic. The results indicate that bycatch dynamics may result from interactions between fishing activity and, possibly, environmental heterogeneity as well. The next stage will integrate oceanographic variables into Species Distribution Models to identify bycatch hotspot areas and support spatial management strategies.

Keywords: Fisheries Management; Hotspot; Longline fisheries; SDMs;

Introdução

A pesca de grandes pelágicos, em especial os atuns, configura-se como uma das principais atividades da pesca comercial em regiões oceânicas tropicais e subtropicais, desempenhando papel estratégico na segurança alimentar global e na geração de emprego e renda (Bornatowski et al., 2018). Segundo dados recentes da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a pesca de atuns e afins movimentou mais de 17 bilhões de dólares em valor desembarcado em 2022, correspondendo a aproximadamente 9% do valor total das exportações mundiais de produtos de animais aquáticos (FAO, 2024). Entre os diferentes petrechos utilizados nessa atividade, o espinhel pelágico destaca-se como uma das principais modalidades de pesca industrial em escala global (Lucena-Frédou et al., 2017), tendo como alvo espécies de elevado valor comercial, como Thunnus albacares, Thunnus alalunga e Xiphias gladius (Majkowski, 2007).

Apesar de sua expressiva relevância socioeconômica, a pesca atuneira também levanta sérias preocupações ambientais. Entre os impactos ecológicos mais significativos associados ao uso do espinhel está a captura incidental (bycatch) de ampla variedade de espécies marinhas vulneráveis ou ameaçadas, como tartarugas, aves e mamíferos, além de outras espécies de peixes com pouco ou nenhum valor comercial (Clarke et al., 2014; Gray & Kennelly, 2018). Estudos indicam que a pesca de espinhel apresenta taxa média de descarte de 28,5%, superada apenas pela pesca de camarão com redes de arrasto, cuja taxa média alcança 62,3% (Kelleher, 2005). Embora o espinhel gere menor descarte que petrechos menos seletivos, ainda é menos eficiente na minimização dos descartes que outras artes de pesca de atuns, como redes de cerco, com taxa média de 5,1%, e vara e isca viva, com apenas 0,4% (Kelleher, 2005).

Além da seletividade associada às diferentes artes de pesca, compreender a dinâmica espaço-temporal da captura incidental é fundamental para identificar os processos ecológicos e operacionais que determinam sua ocorrência e intensidade. A composição e a abundância do bycatch não se distribuem de forma homogênea no espaço e no tempo, pois refletem a interação dinâmica entre a distribuição das espécies, as condições ambientais e os padrões de atividade pesqueira (Pennino et al., 2017; Rezende et al., 2019). Identificar os principais fatores associados às oscilações espaço-temporais do bycatch constitui, portanto, etapa essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo espacial e de medidas de conservação mais eficazes.

No Oceano Atlântico Sul, ainda persistem importantes lacunas de informação sobre a composição, distribuição e variabilidade espaço-temporal do bycatch associado à pesca atuneira de espinhel (Yeh et al., 2013; Oliver et al., 2015; Lucena-Frédou et al., 2016). A escassez de dados sistemáticos e integrados compromete tanto o diagnóstico preciso dos impactos ecológicos quanto a formulação de medidas de mitigação eficazes. Adicionalmente, grande parte dos estudos disponíveis concentra-se em áreas específicas ou utiliza abordagens descritivas (Komoroske; Lewison, 2015; Mannocci et al., 2020; Heidrich et al., 2022), carecendo de análises integrativas e preditivas que considerem o contexto ecossistêmico mais amplo no qual essas interações ocorrem.

Diante desse cenário, o presente projeto propõe uma abordagem ecossistêmica para avaliar a dinâmica espaço-temporal do bycatch na pesca atuneira de espinhel no Atlântico Sul, integrando informações pesqueiras e ambientais por meio de Modelos de Distribuição de Espécies (SDMs, do inglês Species Distribution Models). Esses modelos permitirão identificar os principais determinantes ecológicos e operacionais da captura incidental, mapear hotspots de risco de forma espacialmente explícita e gerar subsídios para a elaboração de estratégias de manejo mais sustentáveis, eficazes e orientadas à conservação espacial da biodiversidade marinha no Atlântico Sul em escala regional.

Metodologia

A área de estudo compreende o Oceano Atlântico Sul (Figura 1), delimitada entre 10°N e 45°S e os meridianos de 0° e 55°W. A dinâmica circulatória da região é dominada pelo Giro Subtropical, formado por um sistema de correntes de grande escala composto pela Corrente do Brasil, Corrente do Atlântico Sul, Corrente de Benguela e Corrente Sul Equatorial (Sant'ana et al., 2025). O movimento dessas correntes é condicionado pela densidade da água, regulada pelos gradientes de temperatura e salinidade. Essa dinâmica do Giro Subtropical facilita processos biofísicos cruciais que concentram a produção biológica e atua como importante mecanismo para a sustentação, agregação e produtividade das pescarias de grandes predadores pelágicos, com destaque para as diferentes espécies de peixes-de-bico (Machado et al., 2026; Sant'ana et al., 2025).

Foram analisados dados da pesca de espinhel que operou no Atlântico Sul entre 1980 e 2016 por embarcações nacionais e arrendadas. O conjunto de dados foi obtido por meio da Comissão Internacional para a Conservação do Atum Atlântico (ICCAT, em inglês), a partir de diários de bordo cujas informações são agregadas em quadrantes espaciais de 1° x 1°. Os dados incluem informações operacionais da pesca (e.g., localidade, esforço pesqueiro e tempo de imersão), além de informações biológicas sobre a captura de espécies-alvo e não-alvo, em número de indivíduos.

Antes das análises, foi realizado controle de qualidade e filtragem dos dados para remover registros inconsistentes, incompletos ou potencialmente errados. Foram excluídos: (i) registros duplicados; (ii) embarcações sem identificação do país de origem; (iii) frotas com esforço amostral insuficiente, definidas como aquelas com apenas um registro de operação em toda a série temporal ou menos de cinco operações em determinado ano; (iv) operações em que o número de indivíduos capturados excedia

o total de anzóis disponíveis; (v) registros com valores biologicamente implausíveis de captura; (vi) pescarias com inconsistências temporais, como formatos de horário incompatíveis decorrentes de erros de preenchimento; (vii) espécies com pouquíssimas capturas ao longo da série temporal; e (viii) operações cujas coordenadas geográficas estavam associadas a áreas terrestres ou localidades espacialmente isoladas do domínio de atuação das respectivas frotas. Após a filtragem, o banco consolidado reuniu 87.421 operações de pesca e 22 grupos taxonômicos categorizados como fauna acompanhante.

Além dos dados pesqueiros, também foram utilizados dados ambientais para avaliar a influência das condições oceanográficas sobre a distribuição espaço-temporal da captura incidental. Conforme a Tabela 1, a base ambiental é composta por 14 variáveis, incluindo variáveis dinâmicas provenientes de diferentes produtos do Copernicus Marine Service (https://data.marine.copernicus.eu/products) e uma variável estática, a profundidade do fundo oceânico, obtida do modelo batimétrico global General Bathymetric Chart of the Oceans (GEBCO; https://www.gebco.net/). Em conjunto, essas variáveis resultaram em uma base de dados ambientais com mais de 84 GB de informações, as quais ainda precisam ser processadas e integradas ao banco de dados pesqueiros.

A dinâmica da fauna acompanhante (bycatch) foi avaliada em termos temporais e espaciais. Para cada operação de pesca (i), a captura incidental foi calculada como a soma da abundância, em número de indivíduos, dos 22 grupos taxonômicos classificados como captura incidental. Devido à elevada heterogeneidade do esforço pesqueiro entre pescarias, a captura incidental foi padronizada pelo esforço, expresso pelo número de anzóis. Nessa relação, $captura_{i,j}$ corresponde ao número de indivíduos da j-ésima espécie classificada como captura incidental na i-ésima operação, e p ao número total de espécies classificadas como bycatch (p = 22). O fator 1.000 foi utilizado para expressar a BPUE como número de indivíduos por 1.000 anzóis, facilitando a interpretação e comparação entre operações.

Inicialmente, foram avaliados os padrões de captura incidental entre as diferentes frotas da pesca atuneira, representadas pelas nações de origem das embarcações, buscando identificar diferenças na magnitude do bycatch entre países. Em seguida, a dinâmica temporal foi investigada por meio da agregação dos registros em escala anual, considerando tanto a captura incidental total quanto a BPUE média de cada ano ao longo da série histórica.

Para avaliar a distribuição espacial do bycatch, foi elaborada uma malha regular (grid) ao longo de toda a área de estudo. A malha possui resolução de 2,5 x 2,5°, com os valores de BPUE associados às respectivas células, permitindo agregá-los espacialmente e caracterizar sua distribuição. Esse procedimento permite reunir operações realizadas em uma mesma célula espacial, reduzindo a influência de registros pontuais e possibilitando comparar espacialmente, em uma escala comum, a intensidade relativa da captura incidental ao longo de toda a área analisada. A variação espaço-temporal foi avaliada em duas escalas: decadal e mensal. Na escala interdecadal, os dados foram agrupados em 1980–1989, 1990–1999, 2000–2009 e 2010–2016, permitindo identificar padrões de expansão, retração ou deslocamento das áreas de maior intensidade de bycatch. Na escala mensal, os dados foram agregados por mês, possibilitando caracterizar a variação sazonal da distribuição espacial da BPUE em toda a área de

estudo do Atlântico Sul e mudanças na localização das áreas de maior intensidade de bycatch ao longo do ano.

Todo o processamento e análise foram realizados no software R, versão 4.6.1 (R Core Team, 2026), utilizando os pacotes tidyverse (Wickham et al., 2019), sf (Pebesma, 2018) e terra (Hijmans, 2023). O tidyverse foi utilizado na organização, processamento e limpeza do banco de dados; o sf, no processamento e manipulação dos dados espaciais; e o terra, no processamento das camadas ambientais em formato matricial (rasters).

Resultados e Discussões

Ao longo da série histórica foram capturados um total de 551.373 indivíduos, distribuídos entre 22 grupos taxonômicos que englobam peixes ósseos, elasmobrânquios, tartarugas, aves e mamíferos marinhos (Figura 2). As maiores capturas incidentais estiveram associadas a grupos agregados de registro, destacando-se os peixes não classificados pelo ICCAT (other fish unclassified; N = 170.737 ind.) e os tubarões não especificados (sharks; N = 82.019 ind.). Em nível de espécie, os maiores volumes de captura incidental corresponderam ao dourado (Coryphaena hippurus; N = 56.606 ind.), seguido pelo o tubarão anequim (Isurus oxyrinchus; N = 33.603 ind.) e o peixe-óleo (Ruvettus pretiosus; N = 25.070 ind.) (Figura 2).

A análise da ocorrência revelou um padrão de baixa frequência de ocorrência para a maioria dos táxons (Tabela 2). O grupo de peixes não classificados (Other_fish_unclassified) liderou em termos de frequência de ocorrência (FO), embora esteve presente em apenas 22,73% das pescarias. Além deste, observou-se que somente quatro táxons registraram uma FO superior a 10%: a categoria genérica de tubarões (Sharks; FO = 16,24%), o dourado (Coryphaena hippurus; FO = 15,85%), o tubarão-anequim (Isurus oxyrinchus; FO = 15,17%) e a cavala-wahoo (Acanthocybium solandri; FO = 11,51%). Os 17 grupos remanescentes demonstraram ocorrência de caráter ocasional ou raro (FO < 7%), com proporções de ausência ultrapassando 95% na maior parte dos casos (e.g., Galeocerdo cuvier e Alopias sp2). Esse resultado, portanto, implica que as capturas incidentais são dominadas por poucas espécies.

Entre os 17 países atuantes na pesca de espinhel no Atlântico Sul, a frota brasileira (BRA) apresentou a maior contribuição para as capturas incidentais (230.762 ind.), seguida pela frota espanhola (ESP; 93.824 ind.) (Figura 3). As frotas do Panamá (PAN), Honduras (HND), Japão (JAP) e São Vicente e Granadinas (VCT) apresentaram contribuições intermediárias, com capturas variando entre 12.000 e 30.000 indivíduos, enquanto as 11 nações restantes contribuíram apenas marginalmente. Esse padrão evidencia uma forte concentração das capturas incidentais entre poucas frotas, com destaque para a frota nacional.

Quando analisado sob o espectro temporal, observa-se que a captura incidental acumulada permaneceu em patamares reduzidos ao longo das duas primeiras décadas da série histórica (Figura 4A). Entre os anos de 1993 à 2003 houve um aumento na captura, com o ano de 2000 registrando o ápice da captura (67.843 ind.). Após este período, as

capturas permaneceram em valores relativamente baixos e estáveis, porém oscilando em torno de uma média maior do que ao que foi registrado no início da série temporal (Figura 4A). Em contraste, quando analisada a dinâmica da captura padronizada, i.e, BPUE, não foi possível detectar praticamente nenhum padrão, à parte de um pico de maior valor observado em 1993 (Figura 4B). É importante destacar, contudo, que a ausência de um padrão está parcialmente mascarado pela alta variabilidade anual de BPUE.

Curiosamente, observa-se que o pico de captura incidental acumulada registrado no ano 2000 coincide diretamente com a dinâmica de expansão e ingresso de frotas arrendadas no Atlântico Sul (Figura 5). A partir do período de 1997, foram registrados a atuação massiva e simultânea de diversas frotas internacionais (ex.: Espanha, Panamá, Honduras, São Vicente e Granadinas, Uruguai e Portugal), além da própria frota brasileira. Esse ápice no volume total de bycatch em 2000 decorre, portanto, do esforço pesqueiro conjunto e acumulado exercido por essas nações, com destaque para a expressiva contribuição do Brasil e da Espanha (Figura 5).

Ao avaliar a dinâmica anual das cinco categorias taxonômicas mais abundantes, foi possível constatar padrões divergentes (Figura 6). Para os grupos de peixes não classificados (Other fish unclassified), por exemplo, observou-se um aumento gradual na captura padronizada, com um pico de captura registrado em 1990, e posterior declínio gradual até o final da série histórica. Já as espécies C. hippurus (dourado) e I. oxyrinchus (tubarão-anequim) demonstraram uma tendência de ascensão ao longo do tempo, com maiores valores culminando em torno dos anos 2000 e 2013, respectivamente. Cabe destacar também a dinâmica Ruvettus prestiosus (peixe-óleo), a qual surge como captura a partir do fim da década de 90 e início dos anos 2000 com ápice no ano de 2013. O grupo dos tubarões (Sharks) apresenta uma grande participação ao longo de todo recorte temporal, sem um ápice muito expressivo sendo contido em uma mesma faixa de variação, culminando em uma redução por volta dos anos 2012 até o fim da sequência de dados.

A distribuição espacial acumulada do bycatch revelou ampla cobertura geográfica na área de estudo, com registros de captura distribuídos de forma relativamente contínua, sobretudo entre a Bacia do Sul do Brasil e a zona de confluência das correntes Brasil–Malvinas (Figura 7). A análise por décadas evidenciou mudanças na extensão da área de atuação da frota e na distribuição espacial das capturas incidentais (Figura 7), padrão também influenciado pela maior disponibilidade de dados a partir dos anos 2000. Na década de 1980, observou-se uma área de atuação relativamente restrita, o que pode estar associado à baixa disponibilidade de dados nos primeiros anos da série histórica. Durante a década de 1990, houve expressiva expansão da área de operação da frota, que alcançou aproximadamente 16.475.400 km² (Tabela 3), com as maiores concentrações de capturas incidentais registradas ao longo da costa brasileira. Já na década de 2000, foi registrada a maior extensão espacial da atividade, com uma área de 19.974.600 km², correspondente a um aumento de 21% em relação à década anterior (Tabela 3). Nesse período, as capturas incidentais apresentaram distribuição mais homogênea ao longo da área de estudos. A década de 2010, por sua vez, apresentou retração de 14,6% na área de operação da frota (Tabela 3), acompanhada por uma reorganização espacial das capturas incidentais, caracterizada pelo surgimento de hotspots isolados no extremo sul e sudeste do Atlântico Sul.

A expansão da área de atuação observada a partir da década de 1990 também pode estar associada à intensificação da atividade pesqueira e ao ingresso de diferentes frotas no Atlântico Sul (Hazin, 2005). Esse processo ampliou espacialmente a exposição da fauna pelágica às operações de espinhel e pode ter contribuído para o aumento da captura incidental total registrado no período. Entretanto, esse padrão não implica necessariamente um aumento proporcional na taxa de captura incidental, uma vez que parte da elevação no número absoluto de indivíduos capturados pode decorrer do próprio aumento do esforço e da extensão da área explorada. Nesse sentido, a análise conjunta da captura total e da BPUE é fundamental para distinguir mudanças relacionadas à expansão da atividade pesqueira daquelas potencialmente associadas à distribuição e disponibilidade da fauna acompanhante.

Por fim, a variabilidade sazonal, aqui avaliada em escala mensal, revelou um padrão caracterizado pela transição entre períodos de baixa intensidade e de acentuado adensamento das capturas ao longo do ano (Figura 8). Entre janeiro e agosto, as taxas de bycatch permaneceram relativamente baixas, com distribuição espacial homogênea ao longo da área de estudo. A partir de setembro, observou-se um aumento nas taxas de captura incidental, as quais permaneceram elevadas até dezembro. Durante esse último quadrimestre, percebe-se que capturas incidentais concentram-se principalmente na região sudoeste do Atlântico Sul. Uma parcela do padrão observado pode estar relacionada à própria dinâmica ambiental, uma vez que a distribuição espaço-temporal da fauna acompanhante não é determinada exclusivamente pela intensidade ou localização do esforço pesqueiro. Variações nas condições ambientais podem modificar a distribuição, a disponibilidade e a agregação das espécies e, consequentemente, alterar a probabilidade de interação desses organismos com as operações de pesca. Nesse sentido, Pennino et al. (2017) demonstraram que a composição dos descartes pode responder a uma combinação de fatores espaciais, temporais e ambientais, resultando na formação de áreas de maior concentração de captura incidental. De forma semelhante, Rezende et al. (2019), por meio de modelos espaço-temporais, evidenciaram que a dinâmica do bycatch apresenta forte estruturação espacial e pode variar em função das condições ambientais, com a formação de hotspots de capturas incidentais cuja variação e localidade variam ao longo do tempo. Assim, as variações espaciais e sazonais observadas no presente estudo podem refletir não apenas mudanças na dinâmica das frotas e no esforço pesqueiro, mas também alterações na distribuição e disponibilidade da própria fauna acompanhante em resposta à heterogeneidade ambiental.

Conclusão

Os resultados obtidos até o momento evidenciam elevada heterogeneidade espaço-temporal da captura incidental associada à pesca de espinhel de grandes pelágicos no Atlântico Sul. Embora o bycatch tenha abrangido 22 grupos taxonômicos, as capturas estavam fortemente concentradas em poucas categorias e espécies, com destaque para peixes não classificados, tubarões, C. hippurus, I. oxyrinchus e A. solandri. Também foram observadas diferenças marcantes entre as frotas, com Brasil e Espanha apresentando as maiores contribuições para as capturas incidentais. Temporalmente, a captura apresentou elevada variabilidade, enquanto a análise da BPUE evidenciou a

importância da padronização pelo esforço para reduzir a influência das diferenças na intensidade da atividade pesqueira.

No quesito distribuição espacial, os resultados revelaram ampla ocorrência das capturas incidentais no Atlântico Sul, com maior intensidade principalmente entre a costa sul do Brasil e a região de influência da confluência Brasil–Malvinas. A análise decadal indicou expansão da área de atuação da frota até a década de 2000, seguida por retração na década de 2010 e reorganização espacial das capturas. Em escala mensal, observou-se um padrão sazonal caracterizado por menores taxas de bycatch durante a maior parte do ano, com maior intensidade e concentração espacial observada entre os meses de setembro a dezembro. Esses resultados reforçam a existência de uma dinâmica espacial e temporal não homogênea da captura incidental, potencialmente resultante da interação entre a atividade pesqueira e as condições ambientais.

É importante ressaltar, contudo, que os resultados apresentados no presente relatório são apenas preliminares e correspondem à etapa descritiva de um estudo ainda em andamento. A próxima etapa consistirá na aplicação de Modelos de Distribuição de Espécies (SDMs), integrando os registros de captura às variáveis ambientais baixadas, com o objetivo de avaliar a influência das condições oceanográficas sobre os padrões observados e identificar áreas com maior probabilidade de ocorrência e concentração de bycatch. Espera-se, assim, que a integração entre dados pesqueiros e ambientais contribua para uma compreensão mais abrangente da dinâmica da captura incidental e forneça subsídios para estratégias de manejo espacial e conservação da biodiversidade marinha no Atlântico Sul.

Referências

BORNATOWSKI, H. et al. Ecological role and historical trends of large pelagic predators in a subtropical marine ecosystem of the South Atlantic. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 28, n. 1, p. 241–259, 2018. DOI: 10.1007/s11160-017-9492-z. Acesso em: 6 jun. 2025.

CLARKE, S. et al. Bycatch in longline fisheries for tuna and tuna-like species: a global review of status and mitigation measures. Rome: FAO, 2014. 199 p. (FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, n. 588).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in action. Rome: FAO, 2024. DOI: 10.4060/cd0683en. Acesso em: 28 maio 2025.

GRAY, C. A.; KENNELLY, S. J. Bycatches of endangered, threatened and protected species in marine fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 28, n. 3, p. 521–541, 2018. DOI: 10.1007/s11160-018-9520-7.

Hazin, Humberto Gomes. Influência das variáveis oceanográficas na dinâmica populacional e na pesca do espadarte, Xiphias gladius Linnaeus 1758, capturados pela frota brasileira. 2005. Doutorado em Ciências do Mar – Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Algarve, 2005.

HEIDRICH, K. N. et al. Assessing progress in data reporting by tuna Regional Fisheries Management Organizations. Fish and Fisheries, v. 23, n. 6, p. 1264–1281, 2022. DOI: 10.1111/faf.12687. Acesso em: 28 ago. 2026.

HIJMANS, R. J. terra: Spatial Data Analysis. R package, 2023. Disponível em: CRAN. Acesso em: 29 ago. 2026.

KELLEHER, K. Discards in the world's marine fisheries: an update. Rome: FAO, 2005. 131 p. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 470). Disponível em: FAO. Acesso em: 28 maio 2025.

KOMOROSKE, L. M.; LEWISON, R. L. Addressing fisheries bycatch in a changing world. Frontiers in Marine Science, v. 2, art. 83, 2015. DOI: 10.3389/fmars.2015.00083. Acesso em: 28 ago. 2026.

LUCENA-FRÉDOU, F. et al. Life history traits and fishery patterns of teleosts caught by the tuna longline fishery in the South Atlantic and Indian Oceans. Fisheries Research, v. 179, p. 308–321, 2016. DOI: 10.1016/j.fishres.2016.03.013. Acesso em: 28 ago. 2026.

LUCENA-FRÉDOU, F. et al. Vulnerability of teleosts caught by the pelagic tuna longline fleets in South Atlantic and Western Indian Oceans. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, v. 140, p. 230–241, 2017. DOI: 10.1016/j.dsr2.2016.10.008. Acesso em: 28 maio 2025.

MACHADO, B. N. et al. Niche differentiation among large pelagic fishes in the Southwest Atlantic revealed by stable isotope analysis. Fisheries Oceanography, v. 35, n. 3, p. 347–358, 2026. DOI: 10.1111/fog.70020.

MAJKOWSKI, J. Global fishery resources of tuna and tuna-like species. Rome: FAO, 2007. 66 p. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 483).

MANNOCCI, L. et al. Predicting bycatch hotspots in tropical tuna purse seine fisheries at the basin scale. Global Ecology and Conservation, v. 24, e01393, 2020. DOI: 10.1016/j.gecco.2020.e01393. Acesso em: 28 ago. 2026.

OLIVER, S. et al. Global patterns in the bycatch of sharks and rays. Marine Policy, v. 54, p. 86–97, 2015. DOI: 10.1016/j.marpol.2014.12.017. Acesso em: 28 ago. 2026.

PEBESMA, E. Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data. The R Journal, v. 10, n. 1, p. 439–446, 2018. DOI: 10.32614/RJ-2018-009. Acesso em: 29 ago. 2026.

PENNINO, M. G. et al. Discard management: a spatial multi-criteria approach. Marine Policy, v. 77, p. 144–151, 2017. DOI: 10.1016/j.marpol.2016.12.022. Acesso em: 31 ago. 2026.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2026. Disponível em: R Project. Acesso em: 29 ago. 2026.

REZENDE, G. A. et al. Modelling the spatio-temporal bycatch dynamics in an estuarine small-scale shrimp trawl fishery. Fisheries Research, v. 219, art. 105336, 2019. DOI: 10.1016/j.fishres.2019.105336. Acesso em: 28 ago. 2026.

SANT'ANA, R. et al. Increasing sea surface temperatures driving widespread tropicalization in South Atlantic pelagic fisheries. Biology, v. 14, n. 8, art. 1039, 2025. DOI: 10.3390/biology14081039.

WICKHAM, H. et al. Welcome to the tidyverse. Journal of Open Source Software, v. 4, n. 43, art. 1686, 2019. DOI: 10.21105/joss.01686. Acesso em: 29 ago. 2026.

YEH, Y.-M. et al. Estimates of seabird incidental catch by pelagic longline fisheries in the South Atlantic Ocean. Animal Conservation, v. 16, n. 2, p. 141–152, 2013. DOI: 10.1111/j.1469-1795.2012.00588.x. Acesso em: 28 ago. 2026.

Anexos



Figura 4: Dinâmica temporal da captura incidental total (A) e padronizada pelo esforço pesqueiro (B) ao longo da série histórica.



Figura 1: Áreas de atuação da frota espinheleira no Atlântico Sul: Atlântico sudoeste (AT-SW) e Atlântico nordeste (AT-SE).



Tabela 1: Preditores ambientais que serão considerados para modelar a distribuição espacial e temporal da captura incidental. A coluna U representa a unidade de cada variável.



Figura 2: BPUE total acumulada dos 22 grupos taxonômicos registrados como fauna acompanhante na pesca atuneira no Atlântico Sul entre os anos 1980-2016.



Tabela 2: Frequência de ocorrência (%) da fauna capturada incidentalmente na pesca atuneira no Atlântico Sul durante o período 1980-2016.



Figura 3: Distribuição da BPUE acumulada entre as 17 nações atuantes na pesca de espinhel no Atlântico Sul durante o período 1980–2016. Siglas: BRA (Brasil), ESP (Espanha), PAN (Panamá), HND (Honduras), JAP (Japão), VCT (São Vicente e Granadinas), TAI (Ta



Figura 5: Distribuição interanual da captura total acumulada por fauna acompanhante (bycatch) entre as frotas atuantes no Atlântico Sul durante o período 1980–2016. Siglas: BRA (Brasil), ESP (Espanha), PAN (Panamá), HND (Honduras), JAP (Japão), VCT (São V



Figura 6: Variação temporal da captura incidental padronizada pelo esforço (BPUE) para as cinco categorias mais abundantes da fauna acompanhante na pesca de espinhel no Atlântico Sul (1980–2016). Os pontos e a linha preta indicam a média anual e as áreas



Tabela 3: Área de atuação das frotas no Atlântico Sul ao longo das décadas. O cálculo das áreas foi estimado a partir do número de células do grid ocupadas na década, multiplicado pela área da célula.



Figura 7: Distribuição espacial do BPUE média capturada pela pesca de espinhel no Atlântico Sul, considerando toda a série histórica (Geral), bem como sua variação ao longo das décadas.



Figura 8: Distribuição sazonal da BPUE média capturada pela pesca de espinhel no Atlântico Sul, com valores 1 a 12 correspondendo aos meses de janeiro a dezembro, respectivamente.

CÓDIGO: SB1531

AUTOR: AYRK CALIEL MOURA DE VASCONCELOS

ORIENTADOR: EDUARDO LUIZ VOIGT

TÍTULO: Calogênese in vitro utilizando plântulas de Pityrocarpa moniliformis

Resumo

A Caatinga é um bioma submetido a perturbações antrópicas crônicas, abrigando espécies medicinais promissoras, como a Pityrocarpa moniliformis, que requerem alternativas biotecnológicas para viabilizar seu uso sustentável. O presente estudo objetivou estabelecer culturas de calos in vitro a partir de plântulas desta espécie, visando a futura obtenção de compostos bioativos de interesse farmacológico. Explantes de cotilédone, hipocótilo e raiz foram cultivados em meio nutritivo Woody Plant Medium (WPM) com e sem o regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 2 mg/L por 4 semanas sob condições controladas. Os explantes mais responsivos foram então tratados com concentrações crescentes de 2,4-D (0, 1, 2 e 3 mg/L) por 4 semanas sob as mesmas condições . Os explantes de cotilédone não foram capazes de gerar calos, mas aqueles de hipocótilo e raiz apresentaram calogênese de 71,43% e 69,20%, respectivamente, quando expostos a 2 mg/L de 2,4-D. O presente estudo permite concluir que os explantes de hipocótilo e raiz são os mais promissores para obtenção de calos a partir de plântulas de para P. moniliformis. Sugere-se que uma concentração de 3 mg/L de 2,4-D é promissora para estabelecer culturas de calos, As perspectivas futuras indicam testes de concentrações de diferentes citocinas, visando o aumento da massa de calos para posteriormente verificar presença de metabólitos secundários e seus usos.

Palavras-chave: Calogênese, Pityrocarpa moniliformis, Auxinas, Caatinga, Biotecnologia

TITLE: In vitro callogenesis using Pityrocarpa moniliformis seedlings

Abstract

The Caatinga is a biome subject to chronic anthropogenic disturbances, harbouring promising medicinal species, such as Pityrocarpa moniliformis, which require

biotechnological alternatives to enable their sustainable use. The aim of this study was to establish in vitro callus cultures from seedlings of this species, with a view to the future isolation of bioactive compounds of pharmacological interest. Cotyledon, hypocotyl and root explants were cultured in Woody Plant Medium (WPM) with and without the growth regulator 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at 2 mg/L for 4 weeks under controlled conditions. The most responsive explants were then treated with increasing concentrations of 2,4-D (0, 1, 2 and 3 mg/L) for 4 weeks under the same conditions. Cotyledon explants were unable to produce calli, but hypocotyl and root explants exhibited callogenesis rates of 71.43 per cent and 69.20 per cent, respectively, when exposed to 2 mg/L of 2,4-D. This study leads to the conclusion that hypocotyl and root explants are the most promising for obtaining calli from P. moniliformis seedlings. It is suggested that a concentration of 3 mg/L of 2,4-D is promising for establishing callus cultures. Future prospects include testing different concentrations of cytokinins, with a view to increasing callus mass and subsequently verifying the presence of secondary metabolites and their uses

Keywords: Calogenesis, Pityrocarpa moniliformis, auxins, Caatinga, Biotechnology

Introdução

O Nordeste do Brasil abriga uma das áreas semiáridas mais extensas e diversas do mundo, ocupada por um sistema dinâmico e heterogêneo conhecido como Caatinga, cuja formação vegetal dominante tem sido caracterizada como floresta tropical sazonalmente seca (ARAÚJO et al., 2022). A despeito do seu papel central na oferta de recursos para a sobrevivência das populações locais, a Caatinga é vítima de perturbações antrópicas crônicas, as quais afetam a sua regeneração natural (NOUTCHEU et al., 2024). Neste sentido, é imperativo que o patrimônio biológico da Caatinga seja utilizado de forma sustentável.

Estudos etnobotânicos apontam que a Caatinga é fonte de muitas plantas medicinais, as quais vêm sendo utilizadas pelas populações locais sob a forma de diferentes preparações para diversos usos terapêuticos (MAGALHÃES et al., 2019). Além disso, estudos farmacológicos vêm identificando compostos bioativos oriundos de espécies nativas da Caatinga com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (LAMBERT-MOREIRA et al., 2025). Tendo em vista que o uso de plantas medicinais geralmente é limitado pela disponibilidade de material vegetal para coleta (ARORA et al., 2022) e o habitat de espécies nativas da Caatinga está ameaçado pelo aquecimento global decorrente das atividades antrópicas (SILVA et al., 2022), abordagens alternativas se fazem necessárias para viabilizar o seu uso sustentável.

O cultivo in vitro de plantas medicinais é uma abordagem biotecnológica promissora para a obtenção de compostos bioativos em escala industrial, evitando a coleta predatória de material vegetal (BENJAMIN et al., 2019). Dentre as técnicas disponíveis, as culturas de calos vêm sendo pesquisadas como fontes de compostos bioativos (MOHADDAB et al., 2022). Estas culturas são caracterizadas pela formação de massas celulares indiferenciadas induzidas a partir de diferentes explantes, as quais apresentam elevada plasticidade morfogênica (FEHÉR, 2019). A exposição das massas celulares a agentes bióticos ou abióticos que provocam respostas de defesa (eliciadores) é uma

estratégia comumente usada para induzir a produção de compostos bioativos in vitro (MOHADDAB et al., 2022).

Diante destas motivações, este plano de trabalho objetiva estabelecer culturas de calos a partir de plântulas geradas in vitro da leguminosa arbórea Pityrocarpa moniliformis, a qual é nativa da Caatinga (FREIRE-JÚNIOR e SILVA, 2019). Embora esta espécie apresente atividade antibacteriana atribuída a seus compostos fenólicos (SILVA et al., 2013; TRENTIN et al., 2015), protocolos para cultivo in vitro visando o seu potencial biotecnológico ainda não foram desenvolvidos.

Metodologia

Frutos de P. moniliformis foram coletados de dez árvores mães localizadas na Escola Agrícola de Jundiaí (EAJ) da Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias (UAECIA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), situada em Macaíba (RN). As sementes foram removidas manualmente dos frutos, acondicionadas em sacos plásticos semipermeáveis e conservadas em refrigerador. Para superar a dormência tegumentar, foi feita escarificação mecânica na região oposta ao hilo. Para a pré-assepsia, as sementes foram lavadas com detergente neutro diluído 1:500 durante 1 min e o detergente foi removido em água corrente. Na assepsia em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas com etanol 70% (v/v) por 30 s, seguido de NaClO 0,25% (m/v) por 3 min. Os resíduos destes desinfectantes foram removidos por lavagens com água destilada estéril. Em seguida, as sementes foram transferidas para a superfície de ágar-água 7 g/L contido em frascos e a germinação foi realizada sob condições controladas, incluindo 28 ± 2 graus Celsius, 80 µmol/m2/s e fotoperíodo de 12 h (ALVES-DA-SILVA et al., 2019).
Após 2 dias de cultivo, as sementes germinadas foram transferidas para o meio Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD e McCOWN, 1980) pH 5,7 suplementado com sacarose 2% (m/v) e ágar 7 g/L contido em tubos de vidro vedados com filme de polipropileno. As plântulas foram cultivadas sob as mesmas condições por 4 semanas, quando foram usadas como fontes de explantes para indução de calos. Segmentos com 10 mm de comprimento foram removidos de raiz, hipocótilo e cotilédone e utilizados como unidades amostrais para os experimentos.

incidência de calogênese de diferentes explantes

Após a seleção dos explantes, os mesmos foram expostos a meios de cultura WPM pH 5,7 suplementado com sacarose 2% (m/v) e ágar 7 g/L com presença e ausência de 2,4-D em concentração de 2mg/L, acondicionados em frascos de vidro tampados com filme de polipropileno, visando compreender a resposta dos diferentes segmentos dos órgãos da nativa com relação a calogênese, oxidação, consistência e obtenção de massa, o experimento se deu em um período de 28 dias (4 semanas) sob observação semanal onde ao final o material vegetal foi analisado visualmente quanto a oxidação, coloração e sua massa foi quantificada.

Incidência de calogênese sob curva de auxina

Os explantes com melhor desempenho foram submetidos a uma curva de concentração de

2,4-D em concentrações de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L e 3 mg/L em meio WPM pH 5,7 suplementado com sacarose 2% (m/v) e ágar 7 g/L durante 28 dias (4 semanas), na qual foram avaliados quanto a massa, coloração, textura, e grau de oxidação.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. Um frasco contendo um explante foi uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Games Howel ($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

Escolha do explante

Os dados obtidos após as observações morfológicas denotaram que o explante possui influência na formação de calos a partir de plântulas de P. moniliformis. O cotilédone, independente do meio de cultura, não gera calos, diferentemente do observado para os segmentos de hipocótilo e raiz, que apresentaram calogênese de 7,14% e 22,22% no controle respectivamente, a qual é aumentada quando expostos a 2,4-D 2 mg/L , alcançando 71,14 % e 69,2%, nesta ordem como demonstrado na tabela 1. Embora o tratamento com regulador de crescimento tenha aumentado a calogênese em segmentos de hipocotilo e raiz, não houve diferença significativa entre o controle e a presença de 2,4-D 2 mg/L em termos de acúmulo de massa fresca ao final do experimento.

O controle apresentou incidência de oxidação de 100% nos explantes de cotilédone e hipocótilo, enquanto os segmentos de raiz se mantiveram sem indícios de oxidação. Na presença de 2,4-D, os segmentos de hipocótilo apresentaram uma redução para 85% da oxidação, os segmentos de raiz mostraram um aumento de aproximadamente 8% nesta variável, enquanto os tecidos de cotilédone não apresentaram mudanças aparentes.

A coloração dos tecidos cultivados não foi influenciada pela presença de regulador de crescimento, pois os explantes removidos de cotilédones oxidam e se tornam marrons, enquanto aqueles obtidos de raízes e hipocótilo tem colorações variadas, incluindo verde, marrom e branco amarelado. Além disso, os calos quando presentes, demonstraram consistência friável. Diante destes resultados, os explantes mais adequados para indução de calos foram aqueles extraídos da raiz e do hipocótilo

Concentração de Auxina

Em relação à resposta morfogênica dos tecidos a diferentes concentrações de auxina, houve um aumento da calogênese conforme o aumento da concentração externa de 2,4-D. No entanto, a incidência de calos aumentou até 60% em segmentos de hipocótilo, mas alcançou 100% em segmentos de raiz tratados com a maior concentração de auxina (3 mg/L). Estes resultados são corroborados por aqueles encontrados para outras espécies da mesma família, como Senna alata (LARA et al 2022) e Poincianella

pyramidalis (GOMES-COPELAND et al 2016), pois as respostas de formação de calo aumentaram à medida que as concentrações de auxina aumentaram.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação à massa fresca dos tecidos cultivados no final do experimento, independente do explante e da presença de regulador de crescimento. Notadamente, a taxa de perda de repetições por senescência aumentou consideravelmente, indicando uma diminuição no vigor do lote utilizado durante este estudo.

A oxidação de todos os tecidos se manteve alta, alcançando 100% independentemente dos diferentes meios de cultura e explantes, não apresentando diferenças significativas entre si, reforçando a perda de vigor dos explantes. A coloração dos tecidos cultivados se manteve como no experimento de seleção de explante, com variações incluindo tons de branco e marrom; todavia a incidência de oxidação aumentou a ocorrência da coloração marrom dos explantes. A consistência dos calos formados foi friável, independentemente do tratamento.

Outras espécies florestais apresentam diferentes respostas para oxidação e calogênese quando expostos a fitorreguladores, como Euterpe edulis e Eugenia involucrata (OLIVEIRA et al 2022;STEFENON et al 2020), essa última na presença da auxina ANA (ácido naftaleno acético) na concentração de 5 µM tem resposta positiva de formação de calos e diminuição de sua oxidação ,todavia tendo resposta semelhante à encontrada nos segmentos de hipocótilo e raiz do presente estudo quando exposta a 2,4-D em concentração de 5 µM de maior oxidação principalmente na presença de luz, denotando uma possível variável a ser testada em estudos subsequentes.

Conclusão

O presente estudo permite concluir que os explantes de hipocótilo e raiz são os mais promissores para obtenção de calos a partir de plântulas de para P. moniliformis devido a sua capacidade de gerar massas celulares. Com base na calogênese, é possível sugerir que uma concentração de 3 mg/L de 2,4-D é promissora para estabelecer culturas de calos, mas mais experimentos são necessários para estabelecer um protocolo otimizado para esta espécie, mas frisou a importância do vigor dos explantes iniciais. Com isso mostra-se a importância de estudos mais aprofundados relativos a espécies nativas caatinga e sua compreensão para melhor uso do seu potencial biotecnológico. Propõe-se seguir em frente testando concentrações de diferentes citocinas, visando o aumento da massa de calos para posteriormente verificar presença de metabólitos secundários e seus usos.

Referências

ARAÚJO, H. F. P.; GARDA, A. A.; SILVA, W. A. G.; NASCIMENTO, N. F. F.; MARIANO, E. F.; SILVA, J. M. C. The Caatinga region is a system and not an aggregate. Journal of Arid Environments, v. 203, p. 104778, 2022.

ALVES-DA-SILVA, H.; ALVES-DE-OLIVEIRA, D. F.; AVELINO, A. P.; MACÊDO, C. E. C.; BARROS-GALVÃO, T.; VOIGT, E. L. Salt stress differentially regulates mobilisation of carbon and nitrogen reserves during seedling establishment of Pityrocarpa moniliformis. Plant Biology, v. 21, p. 1110-1118, 2019.

ARORA, K.; RAI, M. K.; SHARMA, A. K. Tissue culture mediated biotechnological interventions in medicinal trees: recent progress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 150, p. 267-287, 2022.

BENJAMIN, E. D.; ISHAKU, G. A.; PEINGURTA, F. A.; AFOLABI, A. S. Callus Culture for the Production of Therapeutic Compounds. American Journal of Plant Biology, v. 4, p. 76-84, 2019.

FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in Plant Science, v. 10, p. 536, 2019.

FREIRE-JÚNIOR, J.M.S.; SILVA, J.S. Mimosoid clade (Leguminosae-Caesalpinioideae) in the Serra dos Montes Altos State Park, Bahia, Brazil. Rodriguesia, v. 70, p. e04162017, 2019.

GOMES-COPELAND, K. K., DA LÉDO, A. S., DAVID, J. P., DE ARAÚJO, A. G., & DE ALMEIDA, F. T. . In vitro callogenesis of Poincianella pyramidalis (catingueira). Revista Brasileira de Farmacognosia, 27(4), 525-528. 2017

LAMBERT-MOREIRA, L. G.; DAMASCENO, G. A. B.; ARAÚJO, T. F.; CHACON, D. S.; SOUZA, L. F. R.; OLIVEIRA, L. L. A.; MORAIS, F. C.; GANADE, G. M. S.; FETT-NETO, A. G.; GIORDANI, R. B. Reflections and Perspectives on the Caatinga Drylands for the Development of Bioactive Plant Products as Medicine. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 35, p. 78-91, 2025.

LARA, E. Y. C., IMAKAWA, A. M., DA SILVA, D., & SAMPAIO, P. D. T. B. In vitro callus induction from different explants of Senna alata (L.) Robx.(Fabaceae). (2022).

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society, v. 30, p.421-427, 1980.

MAGALHÃES, K. N.; GUARNIZ, W. A. S.; SÁ, K. M.; FREIRE, A. B.; MONTEIRO, M. P.; NOJOSA, R. T.; BIESKI, I. G. C.; CUSTÓDIO, G. B.; BALOGUN, S. O.; BANDEIRA, M. A. M. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. Journal of Ethnopharmacology, v. 237, p. 314-353, 2019.

MOHADDAB, M.; EL GOUMI, Y.; GALLO, M.; MONTESANO, D.; ZENGIN, G.; BOUYAHYA, A.; FAKIRI, M. Biotechnology and in vitro culture as an alternative system for secondary metabolite production. Molecules, v. 27, p. 8093, 2022.

NOUTCHEU, R.; OLIVEIRA, F. M. P.; WIRTH, R.; TABARELLI, M.; LEAL, I. R. Chronic human disturbance and environmental forces drive the regeneration mechanisms of a Caatinga dry tropical forest. Perspectives in Ecology and Conservation, v. 22, p. 79-92, 2024.

Oliveira, L. B., de Mello, T., de Araujo, C. P., de Oliveira, J. P. B., Ferreira, A., Zanardo, T. É. C., ... & Carvalho, V. S. (2022). Morphoanotomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in Euterpe edulis Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. Scientia Horticulturae, 299, 111051.

SILVA, J. L. S.; CRUZ-NETO, O.; TABARELLI, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LOPES, A. V. Climate change will likely threaten areas of suitable habitats for the most relevant medicinal plants native to the Caatinga dry forest. Ethnobiology and Conservation, v. 11, p. 15, 2022.

SILVA, J.F.V.; SILVA, L.C.N.; ARRUDA, I.R.S.; SILVA, A.G.; MACEDO, A.J.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.; SILVA, M.V. Antimicrobial activity of Pityrocarpa monilifomis leaves and its capacity to enhance the activity of four antibiotics against Staphylococcus aureus strains. Journal of Medicinal Plants Research, v. 7, p. 2067-2072, 2013.

Stefenon, V. M., Pinheiro, M. V. M., Guerra, M. P., de Freitas, F. R., da Silva, V. J. B., Vieira, P. D. B., & dos Santos, D. D. (2020). In vitro callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in Eugenia uniflora.

TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; FRASSON, A.P.; RZHEPISHEVSKA, O.; DA SILVA, M.V.; PULCINI, E.L.; JAMES, G.; SOARES, G.V.; TASCA, T.; RAMSTEDT, M.; GIORDANI, R.B.; LOPES, N.P.; MACEDO, A.J. Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. Science Reports, v 6, p. 8287, 2015.

Anexos



Tabela-1 Escolha do Explant



Tabela-2 Concentração de auxinas

CÓDIGO: SB1545

AUTOR: PEDRO KAUE ALVES DA SILVA

ORIENTADOR: FERNANDO VAGNER LOBO LADD

TÍTULO: Caracterização morfoquantitativa do gânglio estrelado em Callithrix jacchus

Resumo

Introdução: O gânglio estrelado, ou cervicotorácico, integra o sistema nervoso simpático e participa da modulação cardíaca e de mecanismos relacionados à dor visceral. Sua análise em modelos animais contribui para estudos comparativos e translacionais sobre o SNA. Objetivo: Estimar morfoquantitativamente o gânglio estrelado em Callithrix jacchus, caracterizando assimetrias antiméricas e ligadas ao sexo. Metodologia: Estudo observacional com 4 saguis, dois machos e duas fêmeas, com peso de 300 ± 50 g. Aprovado pela CEUA/UFRN (Protocolo nº 018/2025; Certificado nº 439.018/2025), utilizou amostras de animais previamente empregados em projetos do Núcleo de Primatologia. As análises utilizaram imagens processadas no ImageJ e tecidos corados por hematoxilina e eosina. Resultados: O gânglio foi identificado na transição cervicotorácica. No macho 01, mediu 0,76 cm à esquerda e 1,20 cm à direita; no segundo, 1,3 cm à esquerda e 1,5 cm à direita. Na fêmea, 1,10 cm à esquerda e 1,25 cm à direita; na segunda, 0,58 cm à direita e 0,84 cm à esquerda. A análise histológica evidenciou neurônios pós-ganglionares, células gliais satélites e células SIF. Conclusão: Os achados demonstram variações morfométricas e assimetria bilateral, com tendência a maiores dimensões no exemplar fêmea. Apesar do número amostral, o estudo contribui para a caracterização anatômica do gânglio estrelado. Descritores: Sistema nervoso autônomo. Gânglio estrelado. Primatas. Anatomia comparada.

Palavras-chave: Sistema nervoso autônomo. Gânglio estrelado. Primatas.

TITLE: Morphoquantitative Characterization of the Stellate Ganglion in Callithrix jacchus

Abstract

Introduction: The stellate, or cervicothoracic, ganglion is part of the sympathetic nervous system and participates in cardiac modulation and visceral pain mechanisms. Its study in animal models contributes to comparative and translational research on the autonomic nervous system (ANS). Objective: To morphoquantitatively assess the stellate ganglion in *Callithrix jacchus*, characterizing antimeric and sex-related asymmetries. Methodology: Observational study of four common marmosets, two males and two

females, weighing 300 ± 50 g. Approved by CEUA/UFRN (Protocol 018/2025; Certificate 439.018/2025), samples were from animals previously used in Primate Center projects. Digital images were processed using ImageJ, and tissues stained with hematoxylin and eosin. Results: The ganglion was identified at the cervicothoracic junction. Male 01 measured 0.76 cm left and 1.20 cm right; male 02, 1.3 cm left and 1.5 cm right. Female 01 measured 1.10 cm left and 1.25 cm right; female 02, 0.58 cm right and 0.84 cm left. Histology revealed postganglionic neurons, satellite glial cells, and small intensely fluorescent (SIF) cells. Conclusion: Findings demonstrate morphometric variation and bilateral asymmetry, with a tendency toward larger dimensions in females. Despite the limited sample size, this study contributes to the anatomical characterization of the stellate ganglion. Descriptors: Autonomic nervous system. Stellate ganglion. Primates. Comparative anatomy.

Keywords: Autonomic nervous system. Stellate ganglion. Primates.

Introdução

Ao consultar o material existente, nota-se um volume expressivo de autores que tratam sobre o assunto relacionado aos seres humanos. No entanto, o esperado é que as conclusões que surgem a partir de algumas pesquisas, precisam antes passar por testes em organismos vivos que acontecem com o intuito de mostrar que determinada substância ou técnica é segura e, para isso, passa por diversos cenários que visam mostrar a abrangência dos casos que podem ocorrer na vida real. Com o gânglio estrelado, um assunto muito abordado é o bloqueio desse, objetivando a redução da dor em pacientes em condições que incluem síndrome de dor regional complexa e tratamento não hormonal para fogachos que atingem mulheres nos períodos da peri e após a menopausa (Queiroz, 2025).

Como já foi mencionado, para chegar a esses resultados, se torna necessário usar algumas técnicas que envolvam o uso de animais mostrando, ao final, diferentes características que podem ser observadas e estimadas visando determinar, mensurar e captar qual caminho ou procedimento deve ser percorrido e qual é o que envolve menos riscos, visto que, um dos alvos das experiências envolvendo modelos animais é evitar que os danos se lancem sobre os seres humanos, caminhando ao lado do cuidado que deve sempre estar presente com o bem estar animal. Diante desse cenário, fica claro que é preciso estar atento às diferenças que os animais apresentam. Portanto, analisar sua morfologia, enriquece nosso conhecimento por meio de descobertas que podem ser realizadas, ampliando discussões sobre temas já consolidados e trazendo novas perspectivas sobre assuntos que podem atrair novos horizontes em relação à pesquisa científica. Segundo Kawashima et al. (2009), os macacos do Novo Mundo apresentam uma organização simpática cervical mais simples, reforçando a importância do gânglio estrelado como o principal centro simpático de onde emergem os nervos cardíacos inferiores. Além disso, os autores observaram que, nesses primatas, o gânglio cervical superior está localizado ligeiramente mais cranialmente quando comparado aos primatas do Velho Mundo e aos seres humanos.

Metodologia

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas nacionais para pesquisa animal. O uso de saguis (Callithrix jacchus) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), sob o protocolo Protocolo Nº 018/2025 CERTIFICADO Nº 439.018/2025 . As amostras neuroanatômicas analisadas não envolveram novos procedimentos invasivos, pois foram reutilizadas de animais previamente empregados em outros projetos de pesquisa conduzidos no Centro de Primatologia da UFRN, instituição devidamente registrada no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sob o nº 1/24/92/0039-00. Todas as etapas de processamento, preservação e análise dos tecidos foram realizadas no Laboratório de Neuroanatomia (LABNEURO), vinculado ao Departamento de Morfologia (DMOR/UFRN). Portanto, este trabalho está em plena conformidade com as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos e Educacionais, assegurando o uso responsável e ético dos espécimes disponíveis.

Obtenção dos valores

Para a obtenção dos resultados, as imagens disponíveis foram submetidas à análise no software ImageJ (National Institutes of Health, EUA). Esse software dispõe de ferramentas que permitem a obtenção de medidas morfométricas com elevada precisão, possibilitando a mensuração de estruturas que dificilmente seriam avaliadas por métodos convencionais. Mesmo com algumas limitações em relação a mensuração por causa da presença e interação na imagem de estruturas anatômicas adjacentes, o processo ocorreu sem maiores intercorrências.

Essa etapa constitui um procedimento essencial do estudo, uma vez que garante maior confiabilidade na visualização e na mensuração dos gânglios analisados. Para a determinação do comprimento das estruturas, as imagens obtidas durante o procedimento de dissecação foram importadas para o ImageJ (https://imagej.net/software/fiji/downloads).

A calibração do software foi realizada utilizando-se uma régua presente nas imagens, permitindo a conversão das medidas em pixels para unidades métricas reais (centímetros). Após a calibração, as dimensões dos gânglios foram mensuradas por meio da ferramenta de medição linear do ImageJ, a qual possibilita a personalização dos parâmetros de acordo com os objetivos do estudo.

As imagens acima mostram a interface apresentada ao usuário ao acessar o software. Basicamente, a ferramenta de medição linear, utilizada para obter uma mensuração precisa do tamanho do gânglio, necessita apenas de calibração. Ademais, os resultados são determinados utilizando a média dos 3 valores, com o intuito de ser mais fidedigno à realidade.
Além disso, algumas outras medições foram feitas, após a dissecação, com auxílio de paquímetro. Os dados obtidos constam na seção dos resultados mostrando informações inéditas sobre o assunto e foram provenientes da utilização de 4 animais.

HISTOLOGIA

A coloração por hematoxilina e eosina (HE) foi realizada após as etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Vale dizer que a diafanização foi realizada utilizando xilol e a desidratação contou com uma série crescente de álcoois. Depois de serem

incluídos em blocos de parafina, os tecidos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes de aproximadamente 4µm.
Essa técnica permitiu a adequada diferenciação morfológica dos tecidos e constituiu a base diagnóstica em anatomia patológica (Feldman; Wolfe, 2014), sendo essencial para a visualização das estruturas em microscopia óptica.

Resultados e Discussões

Antes de apresentar os resultados, é necessário situar em que local está esse órgão do sistema nervoso periférico: pode ser localizado na altura da sétima vértebra cervical, lateralmente ao músculo longo do pescoço e posterior à artéria vertebral. Os resultados observados levam em consideração as diferenças entre os gânglios posicionados nos antímeros.

O gânglio estrelado esquerdo apresentou um comprimento de eixo longitudinal de 0,076 cm enquanto o direito apresentou um comprimento de 1,2 cm, no animal identificado como 01 na tabela abaixo. Ao passo que o animal macho identificado com o número 04 possui os seguintes valores: 1,5 cm para o direito e 1,3 cm para o esquerdo. Essa variação diz respeito à assimetria bilateral, conceito bastante abordado e que aparece com muita frequência nos organismos, ao observar, por exemplo, os órgãos pares ou estruturas bilaterais e como eles variam entre si.

Para as fêmeas, os resultados foram parecidos, mas mais próximos um do outro. Sendo encontrados os valores 1,25 cm e 1,10 cm para o lado direito e o esquerdo, respectivamente. Como foram duas fêmeas, o resultado encontrado no outro animal com o auxílio do paquímetro foi de 0,58 cm para o flanco direito e 0,84 cm para o esquerdo.

Além disso, existem relatos que associam variações semelhantes a essa, chamadas de assimetria flutuante, a traços de estresse genético e ambiental ou a mudanças ‘recentes’ em características (De Coster et al., 2013). Contudo, esses achados foram descritos principalmente em relação a estruturas externas, de modo que sua aplicação a casos como o presente deve ser feita com cautela, sem excluir a possibilidade de que a assimetria também contribua para as diferenças observadas.

Como a figura acima demonstra, foram encontrados valores maiores para o macho analisado. Esse resultado pode ter origem em variação anatômica individual ou variação hormonal, sendo necessária cautela interpretativa visto que o tamanho amostral não permite mais conclusões. Os resultados obtidos com o processamento das imagens exibido no microscópio mostra as células próprias do sistema nervoso, chamadas de neurônios simpáticos pós ganglionares (mais visíveis na lâmina), células gliais satélite e células SIF (small intensely fluorescent). Essa é uma típica estrutura da arquitetura simpática (Rusu et al., 2025) que atua de diferentes maneiras, passando por funções mais conhecidas, como no caso das células nervosas, e por funções menos conhecidas, como a liberação de catecolaminas através das células SIF (Matthews, 1989) e por esse motivo são capazes de modular o sinal emitido pelo gânglio, sendo capaz de regulá-lo, gerando, a partir disso, uma resposta que contenha uma variação na intensidade, exibindo uma resposta que pode ser mais acentuada ou mais suave.

No entanto, é necessário debater sobre as diferenças encontradas nesses animais, identificando possíveis causas. Essas diferenças podem ser, portanto, causadas por assimetria flutuante que, por sua vez, são causadas por instabilidade durante o desenvolvimento. No entanto, em estruturas internas e menores, como é o caso do assunto em questão, é necessário cautela na interpretação dessas diferenças, pois fatores anatômicos e funcionais também são capazes de permitir alterações. Dessa maneira, alterações funcionais no gânglio estrelado são descritas da seguinte maneira:

O gânglio estrelado direito aumenta significativamente a frequência cardíaca, retarda a condução atrioventricular, influencia o átrio direito mais fortemente do que o esquerdo, encurta o intervalo QT, contribui em certa medida para o relaxamento miocárdico e é a principal fonte de inervação simpática no ventrículo direito e na parte anterior de ambos os ventrículos. O gânglio estrelado esquerdo aumenta a frequência cardíaca em certa medida, acelera a condução atrioventricular, influencia o átrio esquerdo mais fortemente do que o direito, prolonga o intervalo QT, contribui significativamente para o relaxamento miocárdico e é a principal fonte de inervação simpática da parte posterior dos ventrículos. (ZANDSTRA et al., 2021)

Como existem funções diferentes a serem cumpridas, a anatomia pode refletir essas demandas. Logo, diferenças funcionais podem reverberar na arquitetura morfométrica desse gânglio, permitindo sugerir que vias mais recrutadas possam modular processos de maturação e adaptação neural, embora essa não seja necessariamente a única causa. Trabalhando com hipóteses, a célula neuronal, ao ser submetida a estímulos, pode apresentar alterações estruturais, provocando mudanças potencialmente perceptíveis. Isto é, a demanda pode ser diferente (por exemplo, um dos ventrículos pode trabalhar mais que outro, gerando maior estímulo), e as células podem responder de maneira distinta, o que eventualmente poderia contribuir para modificações no tamanho do gânglio.

Vale ressaltar, entretanto, que essa situação pode acontecer em casos em que o organismo está saudável, mas que é mais comum, de maneira tão pronunciada, ser observada em casos em que o ambiente está desequilibrado ou que não funciona de maneira adequada, como em uma doença. Dessa maneira, esse pode ser um dos motivos, mas pode não ser o único.

Além dessas origens, a explicação para essas divergências também parece se fundamentar em algo simples: a distribuição anatômica local. Em outras palavras, os trajetos das artérias, veias e músculos podem alterar a maneira como os gânglios são distribuídos. Levando em consideração que esses componentes anatômicos ocupam regiões próximas, como é o caso da artéria vertebral, que, aliás, serve como marco anatômico, os gânglios cervicotorácicos são passíveis de apresentar diferenças em decorrência do motivo já explicado, existindo a chance de que essa hipótese não exclua as outras.

Histologicamente, não se nota uma diferença acentuada que crie distintas regiões celulares no gânglio estrelado. No entanto, alguns estudos demonstram que há determinados neurônios que estão mais associados à atuação cardíaca, criando, dessa maneira, uma certa organização que se assemelha a outras encontradas em regiões mais delimitadas. Na micrografia registrada na oitava figura, é possível que haja a representação de subpopulações neuronais antes descritas na literatura.

Sob esse aspecto, são encontrados diversos relatos que ajudam a corroborar a ideia de que há neurônios que se projetam para determinadas regiões, mesmo não sendo gânglios intrínsecos, ou seja, próximos ao órgão-alvo, enquadrando-se muitas vezes no conceito de gânglio extrínseco. Estudos afirmam que neurônios que se projetam para o coração são encontrados agrupados na região craniomedial do gânglio cervicotorácico.

À luz dessa ideia, surge a necessidade de produzir um esquema baseado em autores anteriores que demonstraram a região com neurônios que mais frequentemente ocupa espaço no gânglio estrelado e que se projeta para o coração, alcançando principalmente o nó sinoatrial. Essas projeções já foram representadas em modelos animais, como ratos, mas ainda não em Callithrix jacchus.
Existem razões para esperar uma organização semelhante à encontrada em outros animais, sendo possível produzir o esquema visto abaixo, por meio da justificativa dessas razões, como, por exemplo, a conservação dos sistemas de inervação simpática cardíaca entre mamíferos tornando essa região um provável local de concentração desses neurônios, assim como outros estudos que afirmam existir neurônios centralizados e não desorganizados, reunindo-se (Coote e Chauhan, 2016).

Portanto, é válido elaborar um esquema mostrando o contorno da micrografia do presente artigo, guiando-se pelos motivos já apresentados. Ainda assim, vale lembrar que para estudos futuros, também se mostra importante analisar com o auxílio de traçadores quais caminhos costumam ser percorridos pelas fibras pós ganglionares.

De acordo com Rajendran et al. (2019), os gânglios cardíacos intrínsecos, localizados principalmente na região da superfície do coração, emitem fibras que atuam no nó sinoatrial e no nó atrioventricular, de maneira que existem efeitos na modulação cronotrópica, dromotrópica e inotrópica da função cardíaca. Os gânglios estrelados seguem essa mesma organização, ou seja, sendo possível sua atuação no nó sinoatrial e atrioventricular. A imagem abaixo representa o que a literatura afirma sobre as fibras nervosas que são encontradas no gânglio estrelado, dizendo que os neurônios são encontrados na região craniomedial e que essas fibras são enviadas para as regiões já comentadas. O mapa de calor presente na imagem demonstra que a coloração do centro indica que naquela região existe uma concentração maior de células nervosas que enviam fibras ao coração, quando comparada a região periférica, em azul, do mapa de calor.

Conclusão

Diante do que foi exposto, fica evidente que os valores encontrados nesse estudo expressam diferenças morfométricas entre os gânglios analisados, com tendência de maior diâmetro no exemplar do sagui macho, com números maiores no gânglio esquerdo. Esses valores podem ser justificados e atrelados a fatores funcionais, anatômicos ou a variações biológicas individuais, não sendo possível atribuir uma única causa. As dificuldades metodológicas encontradas giram em torno da medição dos contornos das estruturas analisadas e o tamanho amostral, o que exige reforçar a necessidade de cautela na generalização dos resultados. Para direcionamento futuro, a parcela de indivíduos necessita ser maior, o que resulta em uma resposta mais eficaz e com menos erros na interpretação dos dados. Além disso, análises complementares são de grande valia. Por fim, esse estudo é de grande importância pois permite tratar de um assunto que não costuma ser muito abordado: o gânglio estrelado e os primatas. O que representa uma

novidade, sendo possível discutir uma área ainda pouco explorada. Sendo assim, a caracterização morfológica apresentada neste estudo fornece uma base anatômica que poderá subsidiar futuras investigações sobre a organização funcional dessa região em primatas.

Referências

COOTE, John H.; CHAUHAN, Rajendra A. **The sympathetic innervation of the heart: important new insights**. *Autonomic Neuroscience*, v. 199, p. 17–23, 2016.

DE COSTER, G.; VAN DONGEN, S.; MALAKI, P.; MUCHANE, M.; ALCÁNTARA-EXPOSITO, A.; MATHEVE, H.; LENS, L. **Fluctuating Asymmetry and Environmental Stress: Understanding the Role of Trait History**. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e57966, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057966.

FELDMAN, A. T.; WOLFE, D. **Tissue processing and hematoxylin and eosin staining.** *Methods in Molecular Biology*, v. 1180, p. 31–43, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3.

KAWASHIMA, T.; THORINGTON JUNIOR, R. W.; WHATTON, J. F. **Comparative anatomy and evolution of the cardiac innervation in New World monkeys (*Platyrrhini*, E. Geoffroy, 1812)**. *The Anatomical Record*, v. 292, n. 8, p. 1231–1244, 2009. DOI: 10.1002/ar.20894.

MATTHEWS, M. R. **Small, intensely fluorescent cells and the paraneuron concept**. *Journal of Electron Microscopy Technique*, v. 12, n. 4, p. 408–416, 1989. DOI: 10.1002/jemt.1060120413. PMID: 2671307.

PROFISSÃO BIOTEC. **Ética na experimentação animal: por que ainda usamos animais?** Disponível em: https://profissaobiotec.com.br/etica-experimentacao-animal-porque-ainda-usamos-animais/. Acesso em: 25 jan. 2026.

QUEIROZ, Gabriela. *Bloqueio do gânglio estrelado no tratamento de fogachos em mulheres na menopausa*. **Portal Afya – Anestesiologia**, 31 jan. 2025. Disponível em: https://portal.afya.com.br/anestesiologia/bloqueio-do-ganglio-estrelado-no-tratamento-de-fogacho-em-mulheres-na-menopausa. Acesso em: 27 jan. 2026.

RAJENDRAN, Pradeep S.; CHALLIS, Rosemary C.; FOWLKES, Charless C. et al. **Identification of peripheral neural circuits that regulate heart rate using optogenetic and viral vector strategies**. *Nature Communications*, v. 10, art. 1944, 2019.

RUSU, Mugurel Constantin; MUNTEANU, Ionuț Mădălin; VRAPCIU, Alexandra Diana; JIANU, Adelina Maria; HOSTIUC, Sorin; TUDOSE, Răzvan Costin; MOTOC, Andrei Gheorghe Marius. **Anatomy, Imaging, and Clinical Significance of the Cervicothoracic (Stellate) Ganglion**. *Diagnostics (Basel)*, v. 15, n. 22, p. 2911, 17 nov. 2025. DOI: 10.3390/diagnostics15222911. PMID: 41300935.

ZANDSTRA, T. E.; NOTENBOOM, R. G. E.; WINK, J.; KIÈS, P.; VLIEGEN, H. W.; EGOROVA, A. D.; SCHALIJ, M. J.; DE RUITER, M. C.; JONGBLOED, M. R. M.

Asymmetry and heterogeneity: part and parcel in cardiac autonomic innervation and function. *Frontiers in Physiology*, v. 12, 16 set. 2021. DOI: 10.3389/fphys.2021.665298. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8481575/. Acesso em: 8 fev. 2026.

CÓDIGO: SB1553

AUTOR: CATHERINE BRONNIMANN

COAUTOR: MELINA FERREIRA MARTELLO

ORIENTADOR: GUILHERME ORTIGARA LONGO

TÍTULO: Microhabitats de corais zooxantelados em recifes rasos do Banco dos Abrolhos

Resumo

O Banco dos Abrolhos abriga os maiores e mais complexos recifes de corais do Atlântico Sul. Entretanto, diversos estressores ambientais, locais e globais, degradam essa rica região, podendo afetar a saúde dos corais zooxantelados. Através de 24 transectos e 240 foto-quadrados em seis pontos da região, investigamos se a saúde dos corais varia de acordo com as condições de microhabitat, arco recifal, ou grupo funcional das espécies. Corais ramificados, localizados predominantemente em profundidades maiores e na borda, e massivos de crescimento rápido apresentaram piores condições de saúde, indicando maior vulnerabilidade a estressores e propensão à branqueamento e mortalidade, enquanto corais massivos de crescimento lento e oportunistas aparentam ser mais tolerantes e resilientes. Em geral, corais massivos se localizam em ambientes mais expostos e rasos, enquanto os oportunistas ocupam microhabitats variados, corroborando possivelmente com suas melhores condições de saúde. Colônias no arco interno, sobretudo dos grupos funcionais mais vulneráveis, exibiram piores condições de saúde que no arco externo, onde há uma área de proteção integral. Portanto, os resultados destacam a importância de considerar diferenças espaciais e funcionais, visto que a interação entre esses fatores pode moldar a resposta desses organismos às condições ambientais, permitindo informar estratégias de conservação que reduzam impactos locais nos recifes do Banco dos Abrolhos.

Palavras-chave: saúde; coloração; mortalidade parcial; grupo funcional; Atlântico Sul.

TITLE: Microhabitats of zooxanthellate corals in shallow reefs of the Abrolhos Bank

Abstract

The Abrolhos Bank is home to the largest and most complex coral reefs in the South Atlantic. However, various local and global environmental stressors are degrading this rich region, which may affect the health of zooxanthellate corals. Using 24 transects and 240 photoquadrats at six sites in the region, we investigated whether coral health varies according to microhabitat conditions, reef arc, or the functional group of the species. Branching corals, found predominantly at greater depths and along the reef edge, and fast-growing massive corals exhibited poorer health, indicating greater vulnerability to stressors and a higher propensity for bleaching and mortality, while slow-growing massive corals and weddy corals appear to be more tolerant and resilient. In general, massive corals are found in more exposed and shallow environments, while weddy corals occupy varied microhabitats, which may account for their better health status. Colonies on the inner reef arc, especially those belonging to the most vulnerable functional groups, exhibited poorer health than those on the outer reef arc, where there is a fully protected marine area. Therefore, the results highlight the importance of considering spatial and functional differences, as the interaction between these factors can shape these organisms' response to environmental conditions, thereby informing conservation strategies that reduce local impacts on the reefs of the Abrolhos Bank.

Keywords: health; color; partial mortality; functional group; South Atlantic

Introdução

O Banco dos Abrolhos abrange os maiores e mais complexos recifes de corais do Atlântico Sul (Leão 2002), incluindo o primeiro Parque Nacional Marinho do Brasil, no arquipélago dos Abrolhos. Além disso, é considerado um importante hotspot de biodiversidade por abrigar diversas espécies endêmicas da costa brasileira, incluindo importantes corais zooxantelados, como os corais-cérebro (Zoffoli et al. 2021, Bleuel et al. 2024).

Entretanto, diversos estressores ambientais contribuem para a degradação desta área, tendo em vista que os impactos antropogênicos, juntamente com as mudanças climáticas, como o aumento da temperatura dos oceanos, tornam os corais cada vez mais suscetíveis ao branqueamento (Sabadini et al. 2020). A distância dos recifes da costa urbanizada, as atividades de turismo e a poluição, também são fatores que intensificam esses efeitos, que podem resultar em piores condições de saúde dos corais, determinada por cores mais claras e perda de pigmentação (branqueamento), e mortalidade parcial ou total nas colônias (Siebeck et al. 2006), frequentemente surgindo após eventos de estresse térmico (Ferreira et al. 2021).

Nesse sentido, há evidências de que os corais localizados nos recifes mais próximos da costa, no arco interno de Abrolhos, apresentam piores condições de saúde em comparação aos corais do arco externo, possivelmente por não estarem situados em área de proteção integral, e estarem localizados próximas das áreas de urbanização costeira (Sabadini et al. 2020). Tal estado é ainda

mais evidente em eventos de estresse térmico, como o período amostrado pelo presente projeto, em 2025, estabelecido como alerta nível 1 de branqueamento pela National Oceanic and Atmospheric Administration, com um aumento significativo de mais de 1 grau Celsius nos oceanos (NOAA 2025).

Contudo, já foi observado que diferentes grupos funcionais de corais apresentam respostas distintas às pressões locais e globais, com corais ramificados (representados pelo hidrocoral do gênero Millepora) apresentando-se mais vulneráveis aos estressores ambientais, exibindo maiores taxas de branqueamento e mortalidade (Ferreira et al 2021; McClanahan 2004). Por outro lado, corais massivos de crescimento rápido e lento, e espécies oportunistas, parecem ser mais resilientes, apresentando melhores condições de saúde (Carlos-Junior et al. 2026). Dessa forma, é evidente que diferentes grupos funcionais e os locais que eles habitam podem resultar em respostas distintas das colônias aos estressores ambientais.

Associada à localização e grupo funcional, investigar os microhabitats ocupados pelas colônias também se faz relevante, uma vez que fatores como a profundidade, exposição, inclinação e posição no recife também podem influenciar as condições de saúde (coloração e mortalidade parcial) para a maioria dos grupos funcionais. Corais localizados em profundidades maiores e com menos exposição possivelmente apresentam melhores condições de saúde. Por outro lado, corais encontrados em profundidades menores no topo dos recifes, onde há mais exposição solar, podem estar sob maior estresse. Já para espécies oportunistas, é possível que as variações de habitat não reflitam muito em sua saúde, uma vez que são corais mais generalistas, com taxas de crescimento rápidas e alto grau de renovação populacional (Darling et al. 2012).

Assim, nosso objetivo foi avaliar o estado de saúde de corais zooxantelados em recifes rasos no Banco dos Abrolhos durante um evento de estresse térmico, investigando a influência da localização no banco recifal (arcos externo e interno), grupo funcional das espécies, e condições de microhabitat associadas.

Metodologia

Área de estudo

Os dados foram coletados no Banco dos Abrolhos, o maior complexo recifal do Oceano Atlântico Sul, que apresenta a maior diversidade de espécies marinhas da região (Ferreira et al. 2021). Os recifes localizam-se na parte norte (entre as coordenadas de 17°20’-18°10’S e 38°35’-39°20’O), com aproximadamente 6.000 km² de extensão, parcialmente protegidos pelo Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (PARNAM Abrolhos; Francini-Filho et al. 2013; Leão 2002). É uma região relativamente rasa, que possui profundidades variando entre meio metro e 30 metros, com recifes altos e estruturas de chapeirões, caracterizados por apresentarem topos e paredes extensas (Leão 2002). Entre as regiões amostradas no arco interno, mais próximo da costa, há os recifes de Pedra

Leste e Sebastião Gomes, localizados em unidades de conservação de uso sustentável. Já o arco externo localiza-se a cerca de 5 km a leste do arquipélago e possui a maioria de seus recifes protegidos pelo PARNAM Abrolhos.

Coleta dos dados

Amostramos seis pontos no Banco dos Abrolhos em maio de 2025 durante um evento de estresse térmico (alerta de branqueamento nível 1 do NOAA; NOAA 2025), quatro no arco externo (Mato Verde, PAB4, Siriba e Ninho da Siriba) e dois no arco interno (Pedra Leste e Sebastião Gomes). Em cada ponto, delimitamos transectos de 20 x 2 m (40 m²), registrando 10 foto-quadrados de 50 x 50 cm, dispostos em lados alternados a cada dois metros, totalizando 24 transectos e 240 foto-quadrados.

Em cada foto-quadrado, havia uma amostra de dados coletada in situ de pelo menos uma colônia de coral, servindo de base para os dados extraídos posteriormente por meio de imagens, totalizando até três colônias analisadas/quadrado. Registramos quatro variáveis de microhabitat: profundidade (distância entre o topo da colônia e a superfície); inclinação (ângulo formado pela base da colônia em relação ao horizonte); habitat (“topo”, “parede”, “borda”, “base” ou “grama marinha”); e exposição (“exposta”, “parcialmente exposta” ou “não exposta”, de acordo com o nível de exposição à luz solar direta). Para classificar o habitat, consideramos “topo” se a colônia estivesse em local mais horizontal e elevado; “parede” se estivesse em substrato mais vertical e elevado; “borda” se estivesse em uma transição entre “topo” e “parede”; “base” se estivesse em substrato baixo, como base da parede ou no fundo; e “grama marinha” se estivesse em um banco de gramas.

Analisamos a intensidade da coloração predominante das colônias pela escala de cores “Coral Health Chart” (Projeto CoralWatch), frequentemente utilizada para associar a cor a mudanças na densidade de zooxantelas simbiontes e a um possível branqueamento do coral (Siebeck et al. 2006). Nessa escala, a intensidade da coloração varia de 1 a 6, de modo que, quanto mais clara (perto de 1), menos saudável está a colônia, e, quanto mais escura (perto de 6), mais saudável. Para visualizar os principais padrões, quantificamos a proporção de colônias em três níveis de coloração: claro (1–2), intermediário (3–4) e escuro (5–6).

Os corais foram designados em quatro grupos funcionais, com base em diferentes características da história de vida das espécies (Carlos-Junior et al. 2026): massivos de crescimento rápido (MCR), caracterizados por terem baixa densidade do esqueleto, rápido crescimento e geralmente tamanhos maiores; massivos de crescimento lento (MCL), com maior densidade do esqueleto e crescimento mais lento; oportunistas (OPT), com crescimento e ciclo de vida rápidos, e geralmente tamanhos menores; e ramificados (RAM), caracterizados por um esqueleto arborescente, e por serem mais especialistas e sensíveis aos estressores ambientais (Carlos-Junior et al. 2026).

Análises estatísticas

Todos os dados foram tabulados e organizados em planilhas Microsoft Excel,

enquanto as análises estatísticas e a geração de gráficos foram realizadas no software R (R Core Team, 2025).

Para avaliar a distribuição dos dados multivariados de microhabitat, utilizamos as variáveis contínuas (inclinação e profundidade) e categóricas (habitat e exposição) para calcular a matriz de distância de Gower, e a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para visualizar os dois primeiros eixos (PCoA1 e PCoA2). Em seguida, obtivemos o centróide (microhabitat médio) de cada grupo funcional e seus respectivos microhabitats mais relacionados.

Calculamos a distância média dos pontos (colônias) para os centróides de microhabitat de cada grupo funcional, aplicando a análise de variância (ANOVA) para checar se as distâncias diferiam entre si e verificando diferenças par a par com o teste de Tukey. Quanto maior a distância média ao centróide, mais generalista é o grupo funcional, e quanto menor, mais especialista, indicando que as colônias ocupam microhabitats mais similares. Posteriormente, verificamos como as variáveis de microhabitat se distribuíam no espaço de ordenação da PCoA, visualizando também a relação entre elas e os grupos funcionais. Utilizamos o primeiro eixo da PCoA (PCoA1), representando um gradiente de microhabitat, para investigar sua influência sobre a saúde dos corais.

Avaliamos se os grupos funcionais, a localização no arco recifal e o microhabitat afetam a intensidade da coloração dos corais, e se esses efeitos interagem entre si. Para isso, quantificamos a proporção de colônias claras, intermediárias e escuras nos dois arcos e nos quatro grupos funcionais, aplicando uma regressão logística ordinal para investigar como os preditores afetam a probabilidade de terem cada nível de coloração. Para a mortalidade parcial, aplicamos uma regressão beta ordinal para comparar a proporção entre os grupos funcionais, relacionando-a com o microhabitat e os arcos recifais. Verificamos a proporção de corais com algum grau de mortalidade entre os grupos e entre os arcos, e analisamos as diferenças nas chances de apresentar maior mortalidade média, par a par para cada grupo funcional, e ao longo do gradiente de microhabitat.

Resultados e Discussões

No total, analisamos 645 colônias de corais, das quais 382 estavam no arco externo e 264 no arco interno. Ao todo, foram identificadas 16 espécies diferentes, representadas pelos quatro grupos funcionais avaliados, com representantes em todos os arcos. Cada grupo funcional apresentou distintos padrões de coloração, mortalidade parcial e uso de microhabitats.

Ao calcular a distância média dos pontos (colônias) para o microhabitat médio (centróide) de cada grupo funcional, visualizamos a variabilidade de microhabitats ocupados por cada grupo (Figura 1), onde os oportunistas apresentaram as maiores distâncias (0,3301), seguidos dos massivos de crescimento lento (0,2696), massivos de crescimento rápido (0,2435) e, por fim,

os corais ramificados (0,1717). Na ANOVA realizada com o teste de dispersão, a diferença entre as distâncias médias dos pontos para os centróides de cada grupo funcional foi significativa ($p < 0,05$) e, ao comparar as diferenças par a par (teste de Tukey), o efeito estava associado aos corais oportunistas, que possuem uma variabilidade significativamente maior de microhabitat se comparado a todos os outros grupos funcionais (massivos de crescimento rápido, massivos de crescimento lento e ramificados). Esses resultados podem ser explicados pelo hábito mais generalista que os oportunistas possuem, adaptando-se a ambientes perturbados com condições diversas (Darling et al. 2012).

Na análise da correlação das variáveis de microhabitat (Envfit), foi possível observar a contribuição de cada uma para a ordenação dos pontos (colônias) nos dois eixos da PCoA (Figura 2). Entre as variáveis contínuas, a profundidade ($r^2 = 0,400$) apresentou maior relação com a distribuição das colônias no espaço do microhabitat do que a inclinação ($r^2 = 0,244$). Nas variáveis categóricas, o habitat apresentou a maior associação com o microhabitat ($r^2 = 0,613$), seguido da exposição ($r^2 = 0,520$). Valores positivos da PCoA1 (eixo X) estão relacionados a locais menos expostos (exposição “parcialmente exposta” ou “não exposta”), com maiores inclinações e habitats de parede, enquanto valores positivos da PCoA2 (eixo Y) estão relacionados a ambientes com maiores profundidades e habitats de borda (Figura 2).

Figura 1. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos dados de microhabitats entre os grupos funcionais de corais (representados pelas cores). Pontos pequenos representam cada amostra (colônia), círculos coloridos com borda preta indicam o centróide (microhabitat médio) de cada grupo funcional de coral, enquanto as elipses representam a variabilidade de microhabitats ocupados por cada grupo.

Observamos que os grupos funcionais apresentaram uma ampla sobreposição de microhabitat (Figura 1), mas é visível que cada grupo possui uma relação maior com determinadas variáveis, tendo em vista que seus centróides estão localizados em diferentes posições nos eixos da PCoA (Figura 2). Os corais ramificados são mais influenciados pelo eixo PCoA2, representado por condições de maior profundidade e borda do recife como habitat principal (mais de 90% das colônias ramificadas). Além disso, possuem uma variação menor no microhabitat, representado pela menor distribuição da elipse em ambos os eixos da PCoA (Figura 1) e entre os habitats, indicando que são corais mais especialistas, colonizando habitats mais específicos. Os corais massivos possuem poucas diferenças em seu microhabitat, tendo em vista que ambos preferem ambientes mais expostos e com baixas profundidades (Figura 2). Entretanto, os massivos de crescimento rápido possuem uma variabilidade ligeiramente menor em microhabitat, se comparado com os de crescimento lento (Figura 1), que se distribuem mais uniformemente. Já os corais oportunistas ocupam uma maior variedade de microhabitats, se distribuindo

amplamente ao longo dos eixos, podendo exibir inclinações maiores, habitats variados, com pouca ou nenhuma exposição (Figuras 1 e 2).

Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos dados de microhabitats entre os grupos funcionais de corais, com a coloração predominante de cada colônia e a distribuição das variáveis de microhabitat no espaço da ordenação. Vetores correspondem às variáveis contínuas (inclinação e profundidade) e triângulos pretos aos níveis das variáveis categóricas (habitat e exposição). Pontos pequenos representam cada amostra (colônia) e círculos coloridos com borda preta indicam o centróide de cada grupo funcional de coral.

Nas análises de coloração, corais ramificados exibiram a maior proporção de cores claras (1–2), totalizando 50% das colônias observadas. Corais massivos apresentaram predominantemente cores intermediárias (3–4), com os de crescimento lento exibindo maior frequência de cores escuras (5–6) que os de crescimento rápido. Corais oportunistas apresentaram, proporcionalmente, mais cores escuras (quase 60% das colônias) e menos cores claras (5%) que os demais grupos. Quanto à localização, 20% dos corais do arco interno exibiram cores claras, aproximadamente o dobro do observado no arco externo, o que reforça a maior suscetibilidade ao branqueamento dos corais localizados no arco próximo a costa, provavelmente devido aos estressores antropogênicos, como o turismo, a pesca e a poluição (Sabadini et al. 2020).

Ao verificar a probabilidade das colônias apresentarem cores claras, intermediárias ou escuras ao longo de um gradiente de microhabitats (representado pela PCoA1), vimos que, de forma geral, microhabitats com menor exposição e maiores inclinações (valores positivos de PCoA1) favorecem colorações mais escuras (Figura 3), devido ao seu efeito positivo significativo sobre os grupos funcionais ($p < 0,001$). Entretanto, os corais massivos de crescimento rápido apresentaram-se uma exceção, com um efeito negativo significativo ao analisá-los juntamente com o microhabitat ($p < 0,001$), de modo que a probabilidade de apresentarem cores mais escuras em microhabitats menos expostos (maiores valores de PCoA1) diminui, e a de apresentarem cores claras aumenta (Figura 3). Isso pode ser explicado em partes pelo efeito negativo significativo ($p < 0,01$) que esse grupo funcional exibe, com menores probabilidades de apresentarem cores escuras de modo geral. No arco interno, essa probabilidade diminui mais ainda, havendo um efeito negativo bastante significativo para essa interação ($p < 0,001$; Figura 4). Logo, é provável que os estressores antropogênicos associados à proximidade da costa alterem significativamente a saúde das colônias desse grupo, como já foi observado anteriormente.

Figura 3. Probabilidade estimada das colônias de corais de cada grupo funcional apresentarem coloração clara, intermediária ou escura ao longo de um gradiente de microhabitats, representado pelo primeiro eixo da Análise de

Coordenadas Principais (PCoA1). Valores positivos e mais elevados de PCoA1 estão associados a microhabitats com menor exposição e maior inclinação do substrato.

Assim como os massivos de crescimento rápido, os corais ramificados localizados no arco interno também exibiram um efeito negativo significativo sobre a coloração ($p < 0,002$), com probabilidades muito menores de apresentarem cores mais escuras em comparação ao arco externo, condizente com sua maior vulnerabilidade aos estressores ambientais, que se concentram no arco interno (Ferreira et al. 2021; Sabadini et al. 2020). Além disso, colorações intermediárias também foram preferíveis por esse grupo no arco externo, e colorações escuras no arco interno foram praticamente inexistentes. Quanto aos oportunistas e massivos de crescimento lento, não houve efeito significativo desses grupos funcionais sobre a probabilidade de coloração, independentemente do arco recifal (Figura 4).

Figura 4. Probabilidade estimada das colônias apresentarem coloração clara, intermediária ou escura de acordo com sua localização (arco recifal) e seu grupo funcional.

Nas análises de mortalidade parcial, os corais ramificados apresentaram, em média, as maiores proporções de necrose em ambos os arcos (27% das colônias), seguidos dos massivos de crescimento rápido (23% das colônias), massivos de crescimento lento (21% das colônias) e, por fim, os oportunistas (9% das colônias, ou seja, 91% não apresentaram sinais de mortalidade). Tal efeito negativo dos oportunistas sobre a mortalidade foi significativo ($p < 0,001$), indicando que o grupo funcional exibe menos necrose, independentemente das condições (Figura 5), demonstrando novamente sua capacidade de colonizar ambientes diversos e previamente perturbados (Darling et al. 2012). Ao comparar a suscetibilidade dos grupos, verificamos que corais massivos de crescimento lento e massivos de crescimento rápido possuem 2,5 vezes mais chances de terem maior proporção de mortalidade parcial do que corais oportunistas, enquanto os ramificados possuem 3,3 vezes mais chances de serem afetados.

Quanto ao microhabitat, encontramos um efeito negativo significativo sobre a mortalidade com o aumento do eixo PCoA1 ($p < 0,001$), indicando que, de forma geral, a mortalidade diminui em microhabitats caracterizados por maiores inclinações e menor exposição (Figura 5), possivelmente devido à atenuação da intensidade de estresse térmico. Já ao comparar as localizações, há uma tendência de visualizarmos maiores mortalidades no arco interno (Figura 5), embora o efeito tenha sido marginalmente significativo ($p = 0,06$).

Figura 5. Proporção estimada de mortalidade parcial das colônias de corais de cada grupo funcional ao longo de um gradiente de microhabitat, representado pelo primeiro eixo da Análise de Coordenadas Principais (PCoA1). Valores positivos e mais elevados de PCoA1 estão associados a microhabitats com menor exposição e maior inclinação do substrato.

Conclusão

A saúde dos corais no Banco dos Abrolhos variou entre grupos funcionais, arcos recifais e diferentes tipos de microhabitat, revelando que a interação entre esses fatores pode moldar a resposta desses organismos às condições ambientais. Corais ramificados, localizados predominantemente em profundidades maiores e na borda, e massivos de crescimento rápido apresentaram piores condições de saúde, indicando maior vulnerabilidade a estressores e propensão à branqueamento e mortalidade, enquanto corais massivos de crescimento lento e oportunistas aparentam ser mais tolerantes e resilientes. Em sua maioria, corais massivos se localizam em ambientes mais expostos e com baixas profundidades. Os oportunistas localizam-se predominantemente em locais com baixa exposição e alta inclinação, corroborando possivelmente com suas melhores condições de saúde. Colônias no arco interno exibiram piores condições de saúde que no arco externo, onde há áreas de proteção integral, possivelmente devido à maior influência de impactos antropogênicos locais associados à costa.

Portanto, os resultados destacam a importância de considerar diferenças funcionais e espaciais em estratégias de conservação que reduzam impactos locais nos recifes do Banco dos Abrolhos diante de eventos de estresse térmico. Logo, faz-se necessário entender a distribuição desses grupos funcionais nas diferentes localizações dos recifes brasileiros, antes de iniciar projetos de conservação, tendo em vista a relação direta da saúde dos corais com as variáveis apresentadas.

Referências

BLEUEL, Jessica et al. Taxonomic and functional diversity of zooxanthellate corals and hydrocorals in Southwestern Atlantic reefs. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 12, 2024. DOI: 10.3389/fevo.2024.1322751

CARLOS-JÚNIOR, L.; CARNEIRO, I.; CARDOSO, F. et al. Insidious shifts in a putative climate change coral refugium. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 293, 2026. DOI: https://doi.org/10.1098/rspb.2025.1957

DARLING, Emily S. et al. Evaluating life-history strategies of reef corals from species traits. Ecology Letters, v. 15, n. 12, p. 1378–1386, 2012.

FERREIRA, L.; GRILLO, A.; REPINALDO, F.; SOUZA, F.; LONGO, G. Different responses of massive and branching corals to a major heatwave at the largest and richest reef complex in South Atlantic. Marine Biology, v. 168, n. 5, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s00227-021-03863-6

FRANCINI-FILHO, Ronaldo B. et al. Dynamics of coral reef benthic assemblages of the Abrolhos Bank, eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. PloS One, v. 8, n. 1, p. e54260, 2013.

LEÃO, Z. Abrolhos, BA: o complexo recifal mais extenso do Atlântico Sul. In: Schobbenhaus, C.; Campos, D. ; Queiroz, E.; Winge, M.; et al. (Ed.), Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil.Brasília, Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil (SIGEP), 2002, v.01, p. 345-359;

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). Current global bleaching: status update & data submission. Coral Reef Watch, 2025. Disponível em: https://coralreefwatch.noaa.gov/satellite/research/coral_bleaching_report.php. Acesso em: 23 abr. 2026.

R CORE TEAM, 2025. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: https://www.R-project.org/

SABADINI, S.; CARVALHO-RIBEIRO, S.; LEÃO, Z.; RUCHKYS, Ú. et al. Modelagem da susceptibilidade ao branqueamento nos corais dos recifes de Abrolhos.Desenvolvimento e Meio Ambiente, v. 54, p. 312–342, 2020. DOI: https://doi.org/10.5380/dma.v54i0.69022

SIEBECK, U.; MARSHALL, N.; KLÜTER, A.; HOEGH-GULDBERG, O. Monitoring coral bleaching using a colour reference card. Coral Reefs, v. 25, n. 3, p. 453–460, 2006. DOI: https://doi.org/10.1007/s00338-006-0123-8

ZOFFOLI, M.; FROUIN, R.; MOURA, R.; MEDEIROS, T. et al. Spatial distribution patterns of coral reefs in the Abrolhos region (Brazil, South Atlantic Ocean). Continental Shelf Research, v. 246, p. 104808, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.csr.2022.104808

Fontes financiadoras

O presente trabalho recebeu apoio da rede de pesquisa INTEGRA-Mar (Chamada PPBio/CNPq/MCTI/FNDCT nº 07/2023; Processo nº 441226/2023-0) para a realização da expedição de campo no Banco dos Abrolhos (maio/2025). Adicionalmente, G. O. Longo contou com bolsa de produtividade em pesquisa concedida pelo CNPq (Processo nº 308072/2022-7).

Anexos



FIGURA1 - Figura 1. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos dados de microhabitats entre os grupos funcionais de corais (representados pelas cores). Pontos pequenos representam cada amostra (colônia), círculos coloridos com borda preta indicam o cent



FIGURA2 - Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos dados de microhabitats entre os grupos funcionais de corais, com a coloração predominante de cada colônia e a distribuição das variáveis de microhabitat no espaço da ordenação. Vetores corre



FIGURA3 - Probabilidade estimada das colônias de corais de cada grupo funcional apresentarem coloração clara, intermediária ou escura ao longo de um gradiente de microhabitats, representado pelo primeiro eixo da Análise de Coordenadas Principais (PCoA1).



FIGURA4 - Probabilidade estimada das colônias apresentarem coloração clara, intermediária ou escura de acordo com sua localização (arco recifal) e seu grupo funcional.



FIGURA5 - Proporção estimada de mortalidade parcial das colônias de corais de cada grupo funcional ao longo de um gradiente de microhabitat, representado pelo primeiro eixo da Análise de Coordenadas Principais (PCoA1). Valores positivos e mais elevados de

CÓDIGO: SB1561

AUTOR: VINICIUS MARIZ DE BRITO PAIVA

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Caracterização da atividade enzimática e fibrinogenolítica da peçonha de Apis mellifera

Resumo

A apitoxina (Api), peçonha da abelha Apis mellifera, é uma fonte rica de moléculas bioativas como melitina, fosfolipase A2 e hialuronidase, apresentando relevante potencial farmacológico e biotecnológico. Este trabalho objetivou caracterizar o perfil proteico, enzimático, fibrinogenolítico, hemolítico e microbiológico da Api, além de obter, caracterizar e avaliar a estabilidade e a atividade antimicrobiana de um nanossistema de quitosana contendo a peçonha. Nos ensaios enzimáticos, a Api apresentou reduzida atividade proteolítica e modesta atividade fosfolipásica (49,3%), mas revelou forte ação hialuronidásica (100% em 20 µg/mL). O ensaio hemolítico evidenciou elevada citotoxicidade (>80% de lise entre 250 e 31,2 µg/mL). O perfil eletroforético em SDS-PAGE sugeriu bandas compatíveis com os principais componentes da Api, enquanto a avaliação fibrinogenolítica não indicou hidrólise do substrato nas condições testadas. As nanopartículas de quitosana obtidas por gelificação iônica apresentaram tamanho entre 125,4 e 153,5 nm, potencial zeta positivo (~+25 mV) e eficiência de incorporação superior a 94%. Nos testes microbiológicos iniciais, a Api livre e as nanopartículas brancas inibiram S. aureus (CIM 7,2 e 44,6 µg/mL), enquanto as formulações nanoestruturadas foram eficazes contra P. aeruginosa (CIM 6,25 e 15,6 µg/mL). Conclui-se que o uso do nanossistema polimérico surge como estratégia promissora para vetorizar a Api e atenuar sua expressiva hemólise.

Palavras-chave: Apis mellifera. Apitoxina. Nanopartículas. Hemólise.

TITLE: Characterization of the enzymatic and fibrinogenolytic activity of Apis mellifera venom

Abstract

Apitoxin (Api), Apis mellifera bee venom, is a rich source of bioactive molecules such as melittin, phospholipase A2, and hyaluronidase, displaying relevant pharmacological and biotechnological potential. This study aimed to characterize the protein, enzymatic, fibrinogenolytic, hemolytic, and antimicrobial profile of Api, as well as to obtain, characterize, and evaluate the stability and antimicrobial activity of a chitosan nanosystem incorporating the venom. In enzymatic assays, Api showed low proteolytic

activity and moderate phospholipase activity (49.3%), but strong hyaluronidase action (100% at 20 µg/mL). The hemolytic assay demonstrated high cytotoxicity (>80% lysis between 250 and 31.2 µg/mL). SDS-PAGE suggested bands consistent with the main components of Api, while the fibrinogenolytic assay showed no substrate hydrolysis under the tested conditions. Chitosan nanoparticles obtained by ionic gelation exhibited mean sizes between 125.4 and 153.5 nm, positive zeta potential (~+25 mV), and incorporation efficiency above 94%. In preliminary microbiological tests, free Api and empty nanoparticles inhibited S. aureus (MIC 7.2 and 44.6 µg/mL), whereas loaded formulations were effective against P. aeruginosa (MIC 6.25 and 15.6 µg/mL). In conclusion, the polymeric nanosystem represents a promising strategy to deliver Api while mitigating its high hemolysis.

Keywords: Apis mellifera. Bee venom. Nanoparticles. Hemolysis.

Introdução

As abelhas africanizadas (Apis mellifera) resultaram do cruzamento acidental no Brasil entre subespécies africanas e europeias, gerando híbridos altamente defensivos e propensos a ataques massivos. Essas abelhas desempenham papéis relevantes nos âmbitos econômico, ecológico, industrial e da saúde, sendo responsáveis pela produção de mel, própolis, geleia real, cera e apitoxina (Api). A Api possui variadas substâncias bioativas, como polipeptídeos, enzimas, proteínas, aminoácidos livres e aminas biogênicas, constituindo uma fonte diversificada com elevado potencial farmacológico e biotecnológico. Pesquisas investigando esses compostos destacam propriedades terapêuticas promissoras, incluindo ações antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, antiparasitária, antimicrobiana e antiviral in vitro e in vivo. Os componentes majoritários da Api são melitina (50%), fosfolipase A2 (10-12%), hialuronidase (1-3%), apamina (1-3%) e o Peptídeo Degranulador de Mastócitos (1-3%). A melitina, peptídeo anfipático e catiônico em α-hélice, forma poros nas membranas celulares induzindo lise, o que confere atividade antimicrobiana e antitumoral, mas também efeitos hemolíticos e citotóxicos severos. Além disso, a fosfolipase A2 e aminas biogênicas desencadeiam dor, inflamação, edema e toxicidade sanguínea. A caracterização de suas atividades enzimáticas é fundamental para compreender os mecanismos envolvidos no envenenamento, visto que a composição da Api varia segundo a dieta, estação do ano, localização geográfica e método de extração por choque elétrico. Dentre as enzimas, destacam-se fosfolipases, hialuronidases e proteases, cuja investigação isolada e associada à atividade fibrinogenolítica amplia o conhecimento biológico sobre o veneno. Como alternativa para contornar esses efeitos adversos, investigam-se nanossistemas farmacêuticos como as nanopartículas de quitosana, que oferecem biocompatibilidade, biodegradabilidade e direcionamento específico de substâncias bioativas, garantindo redução da toxicidade sistêmica. Portanto, pesquisas sobre a Api de A. mellifera são fundamentais para compreender seus efeitos e explorar o uso da nanotecnologia na estabilização e redução de sua toxicidade.

Metodologia

Obtenção da apitoxina: Cadastrada no SisGen, a Api foi extraída por choque elétrico com coletor de vidro no apiário da Escola Agrícola de Jundiaí/UFRN. O equipamento

funcionou por 20 min por colmeia e, após secagem de 2 horas, o material foi raspado, mantido sob refrigeração e dosado pelo método de Bradford. Atividade fosfolipásica: Avaliada turbidimetricamente em placa de 96 poços. Substrato de gema de ovo a 15% em tampão Tris-HCl (pH 7,4) foi incubado com Api (10 a 50 µg/mL) por 60 min a 37 °C, lido em espectrofotômetro a 925 nm. Atividade hialuronidásica: Concentrações de Api (10 a 50 µg/mL) em tampão acetato (pH 6,0) foram pré-incubadas a 37 °C por 30 min com ácido hialurônico. A reação foi interrompida com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e a leitura realizada a 405 nm. Atividade proteolítica: Api (10 a 50 µg/mL) em PBS foi incubada a 37 °C com azocaseína (1% em Tris-HCl, pH 7,5) por 90 min. A reação foi parada com ácido tricloroacético (TCA), centrifugada, o sobrenadante basificado com NaOH e lido a 440 nm. SDS-PAGE e atividade fibrinogenolítica: O perfil proteico foi analisado em gels de polyacrilamida a 12% e 15% corados com Coomassie Blue e nitrato de prata. Para a atividade fibrinogenolítica, Api (5, 10 e 15 µg) foi incubada com 50 µg de fibrinogênio a 37 °C por 60 min, seguidos de fervura e corrida em SDS-PAGE a 12%. Perfil hemolítico: Eritrócitos humanos lavados (CAAE 06999519.3.0000.5292) a 0,8% foram incubados por 60 min a 37 °C com Api (7,81 a 250 µg/mL) em PBS. O sobrenadante foi lido a 540 nm com Triton-X/água destilada e PBS como controles positivo e negativo. Nanopartículas de quitosana: Produzidas por gelificação iônica adicionando TPP 0,1% (2 mL) em quitosana 0,1% em ácido acético 0,175% (5 mL) sob agitação a 700 rpm por 30 min. A Api (1%, 2,5% e 5% p/p) foi pré-solubilizada no TPP. Tamanho e PDI foram determinados por DLS e o potencial zeta por ELS no ZetaSizer. A eficiência de incorporação (EI%) foi avaliada centrifugando as partículas (20.000 x g, 30 min, 4 °C) e dosando a proteína no sobrenadante por BCA. A estabilidade física foi monitorada mensalmente a 4 °C. Testes microbiológicos: Inóculos de S. aureus (ATCC 25923) e P. aeruginosa (ATCC 9027) foram ajustados a $1x10^8$ UFC/mL. A CIM da Api e das NPQs foi obtida por microdiluição em caldo Mueller-Hinton em placas de 96 poços (24 h a 35 °C) com leitura a 595 nm. Alíquotas foram semeadas em ágar para determinação da CBM.

Resultados e Discussões

Ensaios enzimáticos: A Api exibiu baixa atividade proteolítica contra azocaseína (5,4 ± 0,4 U/mL a 10 µg), sem perfil dose-dependente, o que corrobora a literatura indicando que proteases raramente aparecem em quantidades expressivas em peçonhas de Hymenoptera. Em contraste, a atividade da fosfolipase A2 (PLA2) atingiu 49,3 ± 1,35%, também sem dependência estrita de concentração. A PLA2 atua em sinergia com a melitina para hidrolisar fosfolipídeos de membrana e formar poros citotóxicos. A atividade enzimática moderada da PLA2 pode ser justificada pela presença de isoformas Ca^{2+}-dependentes ou variantes com menor eficiência catalítica. Por sua vez, a hialuronidase atingiu 100% de atividade já em 20 µg/mL, agindo como um "fator de espalhamento" que degrada o ácido hialurônico e facilita a penetração tecidual das demais toxinas.

Ensaio hemolítico e perfil proteico: A Api induziu hemólise intensa em eritrócitos humanos (>80% de lise entre 31,2 e 250 µg/mL), atingindo patamar de saturação a partir de 30 µg/mL. Essa citotoxicidade acentuada atesta a necessidade do uso de nanocarreadores para vetorizar a Api e atenuar danos a células sadias. O SDS-PAGE a 15% revelou bandas sugestivas correspondentes à hialuronidase (~54 kDa), PLA2 (~18

kDa) e ao grupo de peptídeos de baixa massa molecular como melitina (~2,8 kDa). A corrida a 12% confirmou bandas marcantes nas faixas de 50-60 kDa e 18 kDa, mas demonstrou retenção/acúmulo no frente de corrida, evidenciando as limitações da técnica para discriminar peptídeos pequenos sem o suporte de espectrometria de massas.

Atividade fibrinogenolítica: A incubação da Api (5, 10 e 15 µg) com 50 µg de fibrinogênio humano não alterou o perfil eletroforético do substrato nem gerou fragmentos de clivagem, indicando ausência de atividade fibrinogenolítica direta nas condições avaliadas.

Caracterização físico-química e estabilidade das NPQs: A NPQ branca apresentou diâmetro médio de 121,0 nm. As nanopartículas incorporadas com Api apresentaram diâmetros de 153,5 nm (1%), 135,7 nm (2,5%) e 125,4 nm (5%), confirmando a alteração estrutural decorrente da associação do veneno. O PDI manteve-se na faixa de 0,40 a 0,48, caracterizando dispersões moderadas. O potencial zeta permaneceu altamente positivo (~+20,6 a +25,8 mV), o que favorece a estabilidade coloidal por repulsão eletrostática e assegura mucoadesão. A eficiência de incorporação (BCA) foi excelente: 96,26% (NPQ-Api 1%), 96,46% (NPQ-Api 2,5%) e 94,31% (NPQ-Api 5%). O acompanhamento inicial de estabilidade a 4 °C aos 30 dias manteve diâmetros entre 102,6 e 123,6 nm.

Ensaio microbiológico: A Api livre e a NPQ branca apresentaram CIM de 7,2 µg/mL e 44,6 µg/mL contra S. aureus. Em relação a P. aeruginosa, as formulações NPQ-Api 1% e 2,5% demonstraram valores de CIM de 6,25 µg/mL e 15,62 µg/mL, respectivamente, evidenciando o potencial das nanoestruturas frente a cepas Gram-negativas clínicas.

Conclusão

Este estudo caracterizou o perfil enzimático e o elevado potencial hemolítico da apitoxina de Apis mellifera, confirmando expressiva atividade hialuronidásica e fosfolipásica, e baixa atividade proteolítica e fibrinogenolítica. A alta taxa hemolítica (>80% em concentrações acima de 31,2 µg/mL) reforça o caráter citotóxico do veneno e fundamenta a necessidade de sistemas de vetorização. O nanossistema polimérico de quitosana obtido por gelificação iônica demonstrou propriedades físico-químicas adequadas, potencial zeta positivo, estabilidade inicial mantida e eficiência de incorporação superior a 94%. Nos testes microbiológicos, as formulações nanoestruturadas inibiram o crescimento de P. aeruginosa. Conclui-se que a nanoencapsulação em quitosana surge como estratégia promissora para preservar as propriedades biológicas da apitoxina e modular sua citotoxicidade.

Referências

BARBOSA, A. et al. Single-arm, multicenter phase I/II clinical trial for the treatment of envenomings by massive Africanized honey bee stings using the unique apilic antivenom. Frontiers in Immunology, v. 12, p. 653151, 2021.

BLEMA, W. Análise da composição da peçonha de Apis mellifera do mato grosso do Sul e os efeitos cinéticos da melitina da atividade da Na, K-ATPase. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2025.

BRAZ, R. Peptídeos análogos do TsAP-2: caracterização estrutural, atividade antimicrobiana e associação com fármacos convencionais. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2025.

CARPENA, M. et al. Bee Venom: Uma Revisão de Atualização de Suas Moléculas Bioativas e Suas Aplicações à Saúde. Nutrients, v. 12, 2020.

CHATZI, M. et al. Desenvolvimento de nanopartículas à base de polímeros para a redução da toxicidade da melitina. Springer, v. 94, 2023.

EDGAR, W. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. Thrombosis Research, v. 2, n. 1, p. 85-95, 1973.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Aqueous leaf extract of Jatropha gossypiifolia L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of Bothrops jararaca snake venom. PLoS ONE, v. 9, n. 8, 2014.

FERREIRA, S. Desenvolvimento e avaliação de antídotos para envenenamento pela serpente Bothrops brazili. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

FRANGIEH, J. et al. Characterization of The Venom from Apis mellifera syriaca, A Honeybee from The Middle East Region. Toxins, v. 11, n. 4, p. 191, 2019.

GAISKI, G. et al. Bee Venom: Composition and Anticancer Properties. Toxins, v. 16, 2024.

GEALH, G. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana da apitoxina de Apis mellifera e das suas frações. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Curitiba, 2024.

IZIDORO, L. et al. Estudo comparativo das toxinas termoestáveis presentes nas peçonhas de algumas serpentes brasileiras e abelhas africanizadas, 1997.

KHALIL, A. et al. Bee venom: From venom to drug. Molecules, 2021.

KIK, C. et al. Neutralization of Apis mellifera bee venom activities by suramin. Toxins, 2013.

MEDEIROS, K. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo a melitina para o tratamento de células tumorais. Dissertação – Brasília, 2015.

MODANESI, M. Produção de apitoxina por abelhas Apis mellifera L. e seu efeito na expressão gênica, 2012.

MORENO, M. et al. Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms: Melittin, Apamin and Mastoparan. Toxins, v. 7, n. 4, 2015.

PAPA, G. et al. The Honey Bee Apis mellifera: An Insect at the Interface between Human and Ecosystem Health. Biology, v. 11, n. 2, p. 233, 2022.

PARENTE, A. Avaliação estrutural e análise das atividades biológicas de peptídeos análogos da Stigmurina. Dissertação – UFRN, Natal, 2017.

PUCCA, M. et al. Bee updated: Current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy. Frontiers in Immunology, v. 10, p. 2090, 2019.

SADEK, K. M. et al. Harnessing the power of bee venom for therapeutic applications. Frontiers in Pharmacology, v. 15, 2024.

SHARAF, M. et al. Bee chitosan nanoparticles loaded with apitoxin as a novel approach to eradication of pathogens. Frontiers in Microbiology, v. 15, 2024.

ZHANG, H. et al. The current landscape of the antimicrobial peptide melittin and its therapeutic potential. Frontiers in Immunology, v. 15, 2024.

Anexos



Figura 1 - Atividades enzimáticas das enzimas fosfolipase A2, hialuronidase e atividade proteolítica da apitoxina. Dados apresentados como média ± DP. (A) Atividade fosfolipásica; (B) Atividade hialuronidásica; (C) Atividade proteolítica. Fonte: Resultado



Figura 2 - Caracterização do perfil hemolítico da apitoxina em eritrócitos humanos. Dados apresentados como média ± DP. (A) Atividade hemolítica da apitoxina. Fonte: Resultados obtidos e analisados.



Figura 3 - Gel de poliacrilamida a 15% SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue. As bandas representam o perfil proteico da apitoxina (Api 25, 50, 75 e 100 µg), respectivamente. Fonte: Resultados obtidos e analisados.



Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 12% SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue. As bandas representam o perfil proteico da apitoxina (Api 50, 100 µg e Api com NPQ), e do marcador molecular (primeira coluna à esquerda do gel). Fonte: Resultados obtido



Figura 5 - Atividade fibrinogenolítica da Api em gel de poliacrilamida a 12% SDS-PAGE corado por Coomassie Brilliant Blue com representação da Api bruta (5, 10 e 15 µg), Api + fibrinogênio e fibrinogênio isolado (50 µg). Fonte: Resultados obtidos e analis



Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das nanopartículas de quitosana contendo a apitoxina nas concentrações 1%, 2,5% e 5%. IDP: Índice de polidispersão; NPQ: Nanopartículas vazias; NPQ-Api 1%: Nanopartículas incorporadas à apitoxina a 1%; NPQ-Api 2,5%:



Tabela 2 - Eficiência de incorporação das nanopartículas de quitosana contendo a apitoxina nas concentrações 1%, 2,5% e 5%. NPQ: Nanopartículas vazias; NPQ-Api 1%: Nanopartículas incorporadas à apitoxina a 1%; NPQ-Api 2,5%: Nanopartículas incorporadas à a



Tabela 3 - Representação da leitura de estabilidade físico-química das nanopartículas de quitosana associadas à apitoxina mantidas a 4 ± 2 °C. NPQ: Nanopartículas vazias; NPQ-Api 1%: Nanopartículas com a apitoxina incorporada a 1%; NPQ-Api 2,5%: Nanopartí



Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da apitoxina livre, NPQ branca e NPQ incorporada. Cenas bacterianas:

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027). Fonte: Resultados experim

CÓDIGO: SB1562

AUTOR: GUSTAVO SOUZA DE LIMA

ORIENTADOR: FULVIO AURELIO DE MORAIS FREIRE

TÍTULO: Desenvolvimento de uma ferramenta de visão computacional (TENSORFLOW) para a identificação dos siris do gênero Callinectes Stimpson, 1860 (Decapoda: Portunidae) da Costa Brasileira

Resumo

A identificação de espécies de siris do gênero Callinectes é importante para estudos taxonômicos, monitoramento ambiental e manejo pesqueiro, porém é dificultada pela elevada similaridade morfológica entre as espécies. Nesse contexto, técnicas de Visão Computacional e Inteligência Artificial podem automatizar e apoiar esse processo. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar modelos computacionais para a classificação automática de espécies de siris da costa brasileira a partir de imagens digitais. Inicialmente, as imagens passaram por pré-processamento, incluindo segmentação e remoção do fundo. Nos modelos de aprendizado de máquina, foram extraídas características morfológicas, geométricas, cromáticas e texturais utilizadas como entrada dos algoritmos. Paralelamente, foram desenvolvidos modelos de Deep Learning baseados em redes neurais convolucionais pré-treinadas, que utilizaram diretamente as imagens para aprender padrões visuais relevantes. Os melhores resultados obtidos pelas abordagens de aprendizado de máquina e Deep Learning apresentaram acurácia superior a 90%, evidenciando o potencial dessas técnicas para a classificação automática das espécies avaliadas.

Palavras-chave: Aprendizado de máquina; Deep learning; classification computer vazio,

TITLE: Machine Learning; Deep Learning; Classification; Computer VisionDevelopment of a computer vision tool (TENSORFLOW) for the identification of crabs of the genus Callinectes Stimpson, 1860

Abstract

The identification of siris species of the genus Callinectes is important for taxonomic studies, environmental monitoring and fisheries management, but is hampered by the high morphological similarity between the species. In this context, Computer Vision and Artificial Intelligence techniques can automate and support this process. This work aimed to develop and evaluate computational models for the automatic classification of

siris species from the Brazilian coast based on digital images. Initially, the images underwent preprocessing, including segmentation and background removal. In the machine learning models, morphological, geometric, chromatic and textural characteristics used as input to the algorithms were extracted. In parallel, Deep Learning models based on pre-trained convolutional neural networks were developed, which directly used images to learn relevant visual patterns. The best results obtained by machine learning and Deep Learning approaches showed accuracy above 90%, highlighting the potential of these techniques for the automatic classification of the evaluated species.

Keywords: Machine Learning; Deep learning; classification computer vazio,

Introdução

Os siris do gênero Callinectes constituem um importante grupo de crustáceos decápodes distribuídos ao longo da costa brasileira, desempenhando papel relevante nos ecossistemas marinhos e estuarinos e na atividade pesqueira. Além de sua importância econômica para comunidades que dependem da pesca artesanal e comercial, essas espécies possuem grande valor científico, sendo utilizadas em estudos de taxonomia, biodiversidade, ecologia e monitoramento ambiental. A identificação correta das espécies é essencial para subsidiar estratégias de conservação, manejo sustentável dos recursos pesqueiros e avaliação dos impactos ambientais sobre os ecossistemas costeiros.

Entretanto, a distinção entre espécies do gênero Callinectes ainda representa um desafio, devido à elevada semelhança morfológica entre elas, envolvendo formato da carapaça, espinhos laterais, coloração e proporções corporais. Embora existam características diagnósticas utilizadas por especialistas, a identificação manual demanda conhecimento taxonômico e está sujeita à subjetividade, podendo gerar inconsistências, principalmente na análise de grandes conjuntos de amostras ou imagens obtidas em diferentes condições. Assim, métodos automatizados tornam-se uma alternativa promissora para aumentar a eficiência e a confiabilidade desse processo.

Nos últimos anos, os avanços em Visão Computacional e Inteligência Artificial possibilitaram o desenvolvimento de sistemas capazes de identificar automaticamente objetos, organismos e padrões em imagens digitais. Em aplicações biológicas, essas técnicas têm sido empregadas na classificação de espécies, identificação de doenças, monitoramento ambiental e reconhecimento de padrões morfológicos. Entre as principais abordagens destacam-se os modelos de aprendizado de máquina, que dependem da extração prévia de características das imagens, e os modelos de Deep Learning, especialmente redes neurais convolucionais (CNNs), capazes de aprender automaticamente representações discriminativas diretamente dos dados.

Na abordagem tradicional de aprendizado de máquina, a qualidade da classificação depende da representação numérica das imagens. Para isso, são utilizados descritores que representam informações morfológicas, geométricas, cromáticas e texturais. Características relacionadas ao contorno, momentos invariantes, distribuição de cores, textura e medidas geométricas descrevem diferentes aspectos da morfologia dos siris, servindo como entrada para algoritmos como Random Forest, Support Vector Machine

e Regressão Logística. Em contrapartida, modelos de Deep Learning dispensam a engenharia manual de atributos, aprendendo automaticamente padrões visuais complexos durante o treinamento, o que frequentemente resulta em maior capacidade de generalização.

Neste contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento e a avaliação de modelos computacionais para a classificação automática de espécies de siris da costa brasileira utilizando imagens digitais. Inicialmente, realizou-se um pré-processamento envolvendo segmentação e remoção do fundo para isolar o organismo e reduzir interferências. Em seguida, foram investigadas duas estratégias: uma baseada na extração de descritores de forma, geometria, cor e textura para treinamento de modelos de aprendizado de máquina e outra baseada em redes neurais convolucionais pré-treinadas para classificação direta das imagens. Por fim, os modelos foram comparados quanto ao desempenho, buscando identificar a abordagem mais eficiente para apoiar a identificação taxonômica automatizada de espécies do gênero Callinectes, contribuindo para pesquisas biológicas, monitoramento ambiental e manejo pesqueiro.

Metodologia

A metodologia desenvolvida neste trabalho compreendeu cinco etapas principais: aquisição das imagens, pré-processamento e segmentação, extração de características, treinamento dos modelos de aprendizado de máquina e desenvolvimento dos modelos de Deep Learning. O fluxo adotado permitiu comparar abordagens baseadas em descritores extraídos manualmente com modelos capazes de aprender automaticamente representações discriminativas a partir das imagens.

O conjunto de dados foi composto por 1.337 imagens pertencentes a seis espécies do gênero Callinectes: C. bocourti, C. danae, C. exasperatus, C. larvatus, C. ornatus e C. sapidus. As imagens foram obtidas em condições padronizadas de aquisição, utilizando o mesmo equipamento fotográfico e um fundo uniforme, reduzindo variações relacionadas à iluminação, resolução e posicionamento dos espécimes. Apesar dessa padronização, permaneceram diferenças naturais entre os indivíduos, como tamanho, coloração, textura e formato da carapaça, características importantes para o processo de classificação. A distribuição das imagens entre as espécies apresentou desbalanceamento, sendo considerado durante a etapa de treinamento dos modelos. A Figura 1 apresenta exemplos de imagens utilizadas no conjunto de dados.

Figura 1 – Exemplos de imagens originais utilizadas no conjunto de dados.

Inicialmente, todas as imagens passaram por uma etapa de pré-processamento com o objetivo de isolar o siri do fundo e reduzir interferências que pudessem comprometer a extração das características. Para isso, as imagens foram convertidas para escala de cinza, submetidas à binarização automática pelo método de Otsu e posteriormente processadas por operações morfológicas destinadas à remoção de ruídos e ao preenchimento de regiões internas. Em seguida, foi realizada a análise de componentes conectados para identificar o maior objeto presente na imagem, assumindo-o como o

espécime de interesse. A máscara obtida foi aplicada à imagem original, preservando apenas o siri e eliminando o fundo, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Exemplos de imagens após a etapa de segmentação e remoção do fundo.

Após a segmentação, foram extraídos descritores capazes de representar diferentes aspectos morfológicos e visuais dos siris. As características contemplaram informações geométricas, como área, perímetro, circularidade, excentricidade, razão de aspecto, solidez e diâmetro equivalente; descritores de forma obtidos por meio dos Momentos Invariantes de Hu; atributos cromáticos representados pelas médias e desvios-padrão dos canais RGB; medidas de textura, como entropia e contraste em escala de cinza; além de descritores relacionados à complexidade da forma por meio da dimensão fractal. Também foram avaliados conjuntos contendo apenas descritores de fronteira, apenas descritores de região e a combinação de ambos, permitindo analisar a contribuição de cada representação para o desempenho dos modelos.

Na abordagem baseada em aprendizado de máquina, os atributos extraídos foram organizados em uma base tabular e divididos em conjuntos de treinamento e teste utilizando amostragem estratificada. As variáveis numéricas foram padronizadas por meio do StandardScaler, enquanto o desbalanceamento entre as classes foi tratado utilizando o algoritmo SMOTE, responsável pela geração sintética de novas amostras das classes minoritárias apenas sobre o conjunto de treinamento. Em seguida, foram treinados modelos de Regressão Logística, Support Vector Machine (SVM), Random Forest e XGBoost. Para os modelos baseados em árvores foram realizados ajustes de hiperparâmetros utilizando validação cruzada, visando obter configurações com melhor capacidade de generalização.

Paralelamente, foi desenvolvida uma abordagem baseada em Deep Learning utilizando redes neurais convolucionais pré-treinadas. Diferentemente dos modelos tradicionais, essa abordagem utilizou diretamente as imagens segmentadas como entrada, dispensando a etapa de engenharia manual de atributos. A estratégia empregou transferência de aprendizado (transfer learning), na qual uma rede previamente treinada foi adaptada ao problema de classificação das espécies de siris por meio da substituição e treinamento das camadas finais da arquitetura, preservando os pesos aprendidos nas camadas iniciais.

Por fim, o desempenho dos modelos foi avaliado por meio das métricas de acurácia, precisão, revocação (recall) e F1-score, complementadas pela análise das matrizes de confusão. Essas métricas permitiram comparar as diferentes abordagens e identificar a estratégia mais adequada para a classificação automática das espécies do gênero Callinectes.

Resultados e Discussões

Os experimentos realizados permitiram avaliar a influência da representação dos atributos e da escolha do algoritmo de classificação na identificação automática de espécies do gênero Callinectes. Foram comparados modelos tradicionais de aprendizado de máquina treinados sobre três conjuntos de descritores extraídos das imagens, além de

modelos baseados em Deep Learning, capazes de aprender automaticamente representações discriminativas. A análise desses experimentos possibilitou identificar as características mais relevantes para o problema e compreender as limitações e potencialidades de cada abordagem.

Inicialmente, os modelos de aprendizado de máquina foram avaliados utilizando três conjuntos de atributos. O primeiro foi composto exclusivamente por descritores de fronteira (Boundary), responsáveis por representar o contorno do espécime por meio de medidas geométricas e descritores de forma. O segundo utilizou apenas descritores de região (Region), incluindo informações relacionadas à distribuição de cores, textura e propriedades internas da imagem segmentada. Por fim, foi construída uma base completa contendo a combinação de todos os atributos extraídos, permitindo avaliar se a utilização conjunta dessas informações produziria uma representação mais discriminativa das espécies.

Os resultados obtidos para cada combinação entre conjunto de atributos e algoritmo classificador demonstraram que a combinação dos descritores de fronteira e região proporcionou desempenho superior às bases individuais para praticamente todos os modelos, evidenciando que essas características fornecem informações complementares. Na base completa, o Random Forest apresentou a maior acurácia entre os modelos tradicionais, alcançando 80,10%, seguido pelo SVM, com 74,13%, e pela Regressão Logística, com 70,65%. Esse resultado demonstra que a utilização conjunta dos diferentes grupos de atributos favoreceu a capacidade discriminativa dos classificadores.

A utilização apenas dos descritores de fronteira produziu resultados satisfatórios, porém inferiores aos obtidos com a base completa. Essa limitação está relacionada à elevada similaridade morfológica existente entre algumas espécies do gênero Callinectes. Embora características como perímetro, circularidade, razão de aspecto, excentricidade e Momentos Invariantes de Hu descrevam o formato externo da carapaça, diversos exemplares compartilham contornos semelhantes, reduzindo o poder discriminativo dessas informações quando utilizadas isoladamente. O Random Forest alcançou 75,12% de acurácia com os descritores de fronteira, enquanto o SVM e a Regressão Logística apresentaram 58,46% e 49,00%, respectivamente.

Os experimentos sobre a base de região apresentaram comportamento semelhante. Nesse caso, os modelos exploraram atributos relacionados às características internas das imagens, como distribuição de cores, medidas estatísticas dos canais RGB, textura e propriedades da região segmentada. Essas informações contribuíram para diferenciar espécies que apresentam variações de coloração e textura superficial. O Random Forest apresentou o melhor resultado nessa configuração, alcançando 69,40% de acurácia, com precisão de 0,68, recall de 0,68 e F1-score de 0,67. Entretanto, ainda foram observadas limitações decorrentes da variabilidade natural entre indivíduos da mesma espécie, dificultando a construção de fronteiras de decisão capazes de generalizar adequadamente para novas amostras.

Os melhores resultados foram obtidos quando todos os descritores extraídos foram utilizados simultaneamente. A combinação das informações geométricas, morfológicas, cromáticas e texturais proporcionou uma representação mais completa dos espécimes, permitindo aos algoritmos explorar diferentes aspectos da morfologia dos siris. Esse comportamento evidencia que atributos distintos capturam informações complementares

e que sua utilização conjunta aumenta a capacidade de separação entre espécies visualmente semelhantes. Na base completa, o Random Forest alcançou 80,10% de acurácia, com precisão de 0,78, recall de 0,79 e F1-score de 0,79. O SVM apresentou 74,13% de acurácia, com precisão, recall e F1-score de 0,73, enquanto a Regressão Logística obteve 70,65% de acurácia, precisão de 0,70, recall de 0,71 e F1-score de 0,69.

Entre os algoritmos avaliados, a Regressão Logística apresentou o menor desempenho geral. Como se trata de um classificador linear, sua capacidade de separação depende da existência de fronteiras aproximadamente lineares entre as classes, condição pouco comum em problemas de classificação biológica envolvendo espécies morfologicamente semelhantes. Esse comportamento é evidenciado pela acurácia de 49,00% na base Boundary, aumentando para 64,43% na base Region e alcançando 70,65% quando todos os atributos foram combinados.

Nos experimentos utilizando apenas os descritores de fronteira, a Regressão Logística apresentou desempenho limitado, indicando que as características disponíveis não eram suficientes para estabelecer uma separação linear eficiente entre todas as espécies. A utilização dos descritores de região elevou a acurácia para 64,43%, enquanto a combinação de todos os atributos resultou no melhor desempenho desse modelo, com 70,65%. Esse comportamento evidencia a importância da complementaridade entre as diferentes representações das imagens.

O modelo Support Vector Machine apresentou desempenho superior ao da Regressão Logística em todas as bases avaliadas. Essa melhoria pode ser atribuída à utilização de funções de kernel, que permitem transformar o espaço original dos atributos, possibilitando a construção de fronteiras de decisão não lineares. Na base Boundary, o modelo alcançou 58,46% de acurácia, enquanto na base Region obteve 62,94%. Com a utilização da base completa, seu desempenho aumentou para 74,13%, acompanhado de precisão, recall e F1-score de 0,73.

Apesar desse avanço, algumas espécies continuaram apresentando índices elevados de confusão. Esse comportamento indica que ainda existe considerável sobreposição entre as distribuições das classes no espaço de atributos. Em outras palavras, determinadas espécies compartilham características morfológicas semelhantes, dificultando sua separação mesmo por classificadores mais sofisticados.

O melhor desempenho entre os modelos tradicionais foi obtido pelo Random Forest. Esse resultado está relacionado às características do algoritmo, baseado na construção de múltiplas árvores de decisão treinadas sobre diferentes subconjuntos de dados e atributos. Essa estratégia reduz o risco de sobreajuste, melhora a capacidade de generalização e permite representar relações não lineares entre as variáveis. Além disso, o Random Forest apresenta robustez diante de conjuntos de atributos heterogêneos, característica importante neste trabalho, no qual foram utilizados descritores geométricos, cromáticos, texturais e morfológicos simultaneamente.

O desempenho obtido demonstra que algoritmos baseados em conjuntos (ensemble learning) apresentam elevada capacidade para lidar com problemas envolvendo grande quantidade de atributos e relações não lineares. Como cada árvore é construída utilizando subconjuntos aleatórios de amostras e atributos, o modelo reduz a variância

observada em árvores individuais e torna-se menos suscetível ao sobreajuste. A superioridade do algoritmo foi observada nas três configurações avaliadas, alcançando 75,12% na base Boundary, 69,40% na base Region e 80,10% na base completa.

Na base composta pela combinação de todos os descritores, o Random Forest alcançou a maior acurácia entre os modelos tradicionais, superando a Regressão Logística e o Support Vector Machine. Esse resultado confirma que a utilização simultânea de informações de forma, geometria, textura e cor fornece uma representação mais completa da morfologia dos espécimes. Além da acurácia de 80,10%, o modelo apresentou precisão de 0,78, recall de 0,79 e F1-score de 0,79.

Embora a acurácia global represente um importante indicador de desempenho, ela não fornece informações suficientes sobre o comportamento do modelo para cada espécie. Dessa forma, torna-se necessária a análise da matriz de confusão, que permite identificar quais classes foram corretamente classificadas e quais apresentaram maiores índices de erro.

A matriz de confusão obtida pelo melhor modelo tradicional foi analisada após o processo de ajuste fino de hiperparâmetros.

A análise da matriz de confusão evidencia predominância de valores ao longo da diagonal principal, indicando que a maior parte das amostras foi corretamente classificada. As classes 0, 1, 3 e 4 apresentaram os melhores resultados, com 82, 76, 47 e 64 classificações corretas, respectivamente. Esse comportamento é consistente com a acurácia global de 80,10% obtida pelo Random Forest na base completa.

As principais confusões ocorreram entre as classes 1 e 4, com 12 amostras da classe 4 classificadas como classe 1 e 7 amostras da classe 1 classificadas como classe 4. Também foram observados erros entre as classes 1 e 2, além de confusões envolvendo as classes 4 e 5. Esses resultados sugerem que essas espécies compartilham características morfológicas semelhantes, como formato da carapaça, espinhos laterais e padrões de coloração, tornando sua distinção mais desafiadora.

As classes 2 e 5 apresentaram desempenho inferior em relação às demais. A classe 2 registrou 23 classificações corretas, enquanto a classe 5 obteve 33 acertos, concentrando erros principalmente em direção às classes 1 e 4. Esse comportamento indica maior sobreposição de características em relação às demais classes, dificultando sua identificação.

De forma geral, a matriz demonstra bom desempenho do classificador, concentrando a maioria das previsões corretas na diagonal principal e limitando os erros a grupos específicos de espécies morfologicamente semelhantes. A matriz complementa a acurácia global de 80,10% ao permitir identificar quais classes apresentam maior dificuldade de classificação, fornecendo informações para futuras melhorias na seleção de atributos e no treinamento.

Os resultados também evidenciam que classes com menor quantidade de amostras apresentaram maior dificuldade de classificação. Embora o algoritmo SMOTE tenha contribuído para reduzir o desbalanceamento durante o treinamento, diferenças na distribuição dos dados ainda influenciam a capacidade de aprendizado dos modelos. Em

bases biológicas, essa situação é comum devido à menor disponibilidade de imagens de determinadas espécies.

Além disso, a variabilidade intraespecífica representa outro fator importante. Indivíduos da mesma espécie podem apresentar diferenças relacionadas ao tamanho corporal, estágio de desenvolvimento, desgaste da carapaça, coloração e condições de iluminação. Essas variações aumentam a dispersão dos dados dentro de uma mesma classe, tornando a classificação mais complexa.

Apesar dessas dificuldades, o Random Forest apresentou comportamento consistente durante os experimentos, mantendo desempenho superior independentemente do conjunto de atributos utilizado. Na base Boundary, o algoritmo alcançou 75,12% de acurácia; na base Region, 69,40%; e na base completa, 80,10%. Essa estabilidade reforça sua adequação para aplicações envolvendo descritores morfológicos extraídos de imagens biológicas, principalmente quando diferentes tipos de características são combinados.

Experimento complementar com imagens do esternito

Diante do desempenho obtido pelos modelos tradicionais na base composta por imagens da região dorsal dos siris, foi realizado um experimento complementar utilizando uma nova base de imagens da região ventral, especificamente do esternito dos espécimes. O objetivo foi investigar se uma região corporal distinta poderia fornecer informações morfológicas mais discriminativas e melhorar o desempenho da classificação.

Diferentemente do experimento anterior, nessa etapa foram avaliados exclusivamente os modelos de aprendizado de máquina, mantendo-se a estratégia geral de utilização de características extraídas das imagens. Foram testados os algoritmos Regressão Logística, Random Forest e Support Vector Machine.

Os resultados demonstraram melhora expressiva no desempenho dos modelos tradicionais quando comparados às imagens da região dorsal. A Regressão Logística apresentou o melhor resultado, alcançando 96,20% de acurácia, com precisão, recall e F1-score de 0,96. O SVM obteve 89,87% de acurácia, com precisão de 0,90, recall de 0,88 e F1-score de 0,89, enquanto o Random Forest alcançou 86,08% de acurácia, com precisão de 0,86, recall de 0,85 e F1-score de 0,85.

A diferença é relevante quando comparada ao melhor resultado obtido na base dorsal. Enquanto o Random Forest alcançou 80,10% de acurácia na região dorsal, a Regressão Logística atingiu 96,20% na nova base, representando diferença de 16,10 pontos percentuais. Esse resultado indica que a nova representação visual forneceu informações mais discriminativas para os modelos de aprendizado de máquina.

Outro aspecto relevante é a mudança no comportamento dos classificadores. Na base dorsal, o Random Forest apresentou o melhor desempenho, enquanto na base do esternito a Regressão Logística apresentou a maior acurácia. Esse resultado sugere que a distribuição dos atributos extraídos na nova região corporal apresenta características mais favoráveis à construção de fronteiras de decisão lineares. Assim, a Regressão Logística alcançou desempenho elevado, atingindo 96,20% de acurácia.

A análise das métricas por classe também evidencia o elevado desempenho da Regressão Logística. As classes 1 e 3 apresentaram precisão, recall e F1-score iguais a 1,00, indicando classificação integralmente correta dessas classes no conjunto de teste. A classe 5 apresentou F1-score de 0,96, enquanto as classes 2 e 4 apresentaram F1-scores de 0,89 e 0,94, respectivamente. Embora tenham ocorrido algumas classificações incorretas, o desempenho permaneceu elevado para todas as classes.

A melhora observada sugere que características presentes na região do esternito podem apresentar maior poder discriminativo entre as espécies do que aquelas capturadas exclusivamente pela região dorsal. A região ventral apresenta estruturas morfológicas que podem fornecer informações relacionadas ao formato, proporções e organização das estruturas corporais, favorecendo a distinção entre espécies visualmente semelhantes.

Entretanto, a comparação entre os dois experimentos deve ser interpretada com cautela, uma vez que as imagens do esternito e as imagens dorsais pertencem a bases distintas. Dessa forma, não é possível atribuir a melhoria exclusivamente à mudança da região corporal, pois diferenças na composição das amostras, quantidade de imagens, distribuição das classes e demais características dos conjuntos também podem influenciar os resultados. Ainda assim, o desempenho obtido indica que a utilização de imagens do esternito constitui uma alternativa promissora e justifica estudos futuros utilizando diferentes regiões anatômicas de forma controlada.

O experimento complementar demonstra que o desempenho inferior observado inicialmente pelos modelos tradicionais não constitui uma limitação absoluta dessas técnicas. Na nova base, a Regressão Logística alcançou 96,20% de acurácia, superando o desempenho dos modelos tradicionais na base dorsal. Esses resultados reforçam a importância da qualidade e da capacidade discriminativa da representação utilizada como entrada, além da escolha do algoritmo de aprendizado.

Embora os modelos tradicionais tenham produzido resultados expressivos, a necessidade de realizar manualmente a engenharia de atributos constitui uma limitação. O processo de segmentação, cálculo dos descritores e seleção das características depende do conhecimento prévio sobre o problema, podendo limitar a capacidade do modelo em capturar padrões visuais complexos. Nesse contexto, modelos baseados em Deep Learning apresentam uma alternativa promissora, pois aprendem automaticamente representações discriminativas durante o treinamento.

A fim de comparar ambas as abordagens, foram desenvolvidos modelos utilizando redes neurais convolucionais pré-treinadas por meio da estratégia de transferência de aprendizado (transfer learning). Diferentemente dos classificadores tradicionais, essas arquiteturas receberam diretamente as imagens segmentadas como entrada, permitindo que características relevantes fossem aprendidas automaticamente.

Os modelos de Deep Learning apresentaram desempenho superior aos classificadores tradicionais, confirmando o potencial das redes neurais convolucionais para problemas de classificação de imagens biológicas. Ao contrário dos algoritmos clássicos, que dependem da definição prévia de descritores, as redes convolucionais aprendem representações hierárquicas diretamente das imagens. Essa característica permite identificar padrões visuais complexos que dificilmente seriam descritos por atributos construídos manualmente.

Os resultados obtidos pelos modelos de Deep Learning demonstraram que todas as arquiteturas avaliadas alcançaram desempenho superior aos modelos tradicionais, evidenciando a eficiência da estratégia baseada em transferência de aprendizado. A utilização de redes previamente treinadas em grandes bases de imagens permitiu aproveitar representações visuais já consolidadas, favorecendo a convergência mesmo utilizando um conjunto de dados menor.

A superioridade dos modelos de Deep Learning pode ser explicada pela capacidade dessas arquiteturas em aprender diferentes níveis de abstração durante o treinamento. Enquanto as primeiras camadas identificam padrões simples, como bordas, linhas e variações de intensidade, camadas mais profundas representam estruturas morfológicas complexas, incluindo formatos da carapaça, distribuição de cores, padrões de textura e relações espaciais. Dessa forma, o modelo constrói uma representação discriminativa sem depender da seleção manual de atributos.

Outro fator que contribuiu para o elevado desempenho foi a utilização da estratégia de transfer learning. Como as redes empregadas já haviam sido treinadas utilizando milhões de imagens, grande parte dos filtros convolucionais já era capaz de identificar padrões visuais genéricos. Durante o treinamento, as camadas finais foram adaptadas ao problema específico da classificação das espécies de siris, permitindo reutilizar o conhecimento previamente adquirido. Essa abordagem reduz a necessidade de grandes conjuntos de dados rotulados, aspecto relevante em aplicações biológicas.

Além do processo de transferência de aprendizado, foi realizado o ajuste fino (fine tuning) das camadas superiores da rede, permitindo que parte dos pesos originalmente aprendidos fosse refinada para representar características específicas do conjunto utilizado. Essa estratégia aumentou a capacidade de adaptação às particularidades morfológicas das espécies do gênero Callinectes.

A comparação entre os modelos tradicionais e os modelos baseados em Deep Learning evidencia diferenças fundamentais. Enquanto os classificadores tradicionais dependem diretamente da qualidade dos descritores previamente definidos, as redes neurais convolucionais realizam simultaneamente a extração das características e a classificação. Como consequência, padrões visuais complexos podem ser descobertos automaticamente durante o treinamento. Essa diferença é evidenciada pelos resultados, uma vez que o melhor modelo tradicional, Random Forest, alcançou 80,10% de acurácia, enquanto o melhor modelo de Deep Learning, MobileNetV2, atingiu 98,50%.

A matriz de confusão obtida pelo modelo de Deep Learning que apresentou o melhor desempenho foi analisada após o processo de ajuste fino.

Conclusão

Este trabalho apresentou uma abordagem baseada em Visão Computacional e Inteligência Artificial para a classificação automática de espécies de siris do gênero

Callinectes a partir de imagens digitais. Foram investigadas estratégias baseadas em aprendizado de máquina, utilizando descritores morfológicos, geométricos, cromáticos e texturais, e em modelos de Deep Learning, capazes de aprender automaticamente representações discriminativas diretamente das imagens.

Os resultados demonstraram que ambas as abordagens apresentaram desempenho satisfatório. Entre os modelos de aprendizado de máquina aplicados às imagens dorsais, o Random Forest obteve o melhor resultado, alcançando 80,10% de acurácia com a combinação dos diferentes descritores. Em um experimento complementar, realizado com imagens da região do esternito, a Regressão Logística alcançou 96,20% de acurácia, evidenciando que a escolha da região corporal utilizada como entrada pode influenciar significativamente a capacidade de discriminação entre as espécies.

Os modelos de Deep Learning apresentaram os melhores resultados gerais. A MobileNetV2 alcançou 98,50% de acurácia, seguida pela ResNet18, com 96,25%, e pela AlexNet, com 91,39%. Esses resultados demonstram o potencial das redes neurais convolucionais em aprender automaticamente características relevantes para a classificação, superando a dependência de descritores definidos manualmente.

A análise das matrizes de confusão mostrou que os principais erros dos modelos tradicionais ocorreram entre espécies com características morfológicas semelhantes. Por outro lado, o elevado desempenho obtido com as imagens do esternito indica que diferentes regiões anatômicas podem fornecer informações complementares para a identificação. Entretanto, essa comparação deve ser interpretada com cautela, devido às diferenças entre as bases utilizadas.

Dessa forma, os resultados evidenciam o potencial da Inteligência Artificial como ferramenta de apoio à identificação taxonômica de espécies do gênero Callinectes, com possíveis aplicações em estudos de biodiversidade, monitoramento ambiental e manejo pesqueiro. A combinação de diferentes representações de imagem e técnicas de aprendizado pode contribuir para o desenvolvimento de sistemas automatizados mais eficientes.

Como trabalhos futuros, sugere-se a ampliação e padronização das bases de imagens, incluindo indivíduos de diferentes regiões e condições de aquisição, além da investigação controlada de diferentes regiões anatômicas. Também podem ser avaliadas novas arquiteturas de redes neurais, técnicas de aumento de dados e métodos de interpretabilidade, buscando aumentar a capacidade de generalização e a confiabilidade dos sistemas desenvolvidos.

Referências

CARVALHO-BATISTA, A.; TEROSSI, M.; ZARA, F. J.; MANTELATTO, F. L.; COSTA, R. C. A multigene and morphological analysis expands the diversity of the seabob shrimp Xiphopenaeus. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.

MELO, G. A. S. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo: Editora Plêiade, 1996.

WILLIAMS, A. B. The swimming crabs of the genus Callinectes (Decapoda: Portunidae). Fishery Bulletin, v. 72, n. 3, p. 685–798, 1974.

PINHEIRO, M. A. A.; BOOS, H. (eds.). Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010–2014. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Carcinologia, 2016.

LECUN, Y.; BENGIO, Y.; HINTON, G. Deep learning. Nature, v. 521, p. 436–444, 2015. DOI: 10.1038/nature14539.

GOODFELLOW, I.; BENGIO, Y.; COURVILLE, A. Deep Learning. Cambridge, MA: MIT Press, 2016.

LI, W.; YANG, Y.; ZHANG, M.; WANG, X. A review of visual descriptors and classification techniques used in leaf species identification. arXiv preprint arXiv:2009.06001, 2020.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Digital Image Processing. 4. ed. Pearson, 2018.

Anexos



siri



Matrz_1_modesto



o_siri

CÓDIGO: SB1564

AUTOR: JOÃO FELIPE SILVA RODRIGUES

ORIENTADOR: ELIZA MARIA XAVIER FREIRE

TÍTULO: Estudo ecomorfológico interpopulacionais de Ameivula ocellifera (Spix, 1825) (Squamata: Teiidae) em diferentes fitofisionomias do Nordeste Setentrional brasileiro

Resumo

O uso de métodos da ecomorfologia, como medidas e observações de campo, permitem que o estudo de morfotipos sejam melhor documentados e como essas adaptações são adquiridas de acordo com o comportamento do animal em seu local de vida, tendo como base seu hábito de forrageio, locomoção e cópula. Nesse contexto, 86 lagartos adultos de Ameivula ocellifera (Spix, 1825) de diferentes localidades da Caatinga e Mata Atlântica do estado do Rio Grande do Norte foram medidos e submetidos a testes analíticos de alometria, PERMANOVA e PCA, para comprovar a existência de variações morfológicas entre essas populações. Os resultados obtidos pelas análises revelaram que há uma diferenciação morfológica na região da cabeça, membros posteriores e dedos da mão e pés na população presente na Caatinga e variação na Largura da Cabeça na população de Mata Atlântica, corroborando com a ideia de que o ambiente seleciona adaptações de acordo com o hábito de vida do indivíduo e que pode haver interferência de fluxo gênico para a expressão dessas variações morfológicas.

Palavras-chave: Ecomorfologia. Domínio. Ameivula. Populações.

TITLE: Ecomorphological study on populations of Ameivula ocellifera (Spix, 1825) (Squamata: Teiidae) in different vegetations types in the brazilian northeast

Abstract

The use of ecomorphological methods, such as morphometrics measurements and field observations, provides a better recording of their morphotypes and how these adaptations are acquired and aligned to the animal behaviour in your place of life, based on foraging locomotion and copulation habits. In this context, 86 adult lizards of Ameivula ocellifera (Spix, 1825), from different locations across Caatinga and Atlantic Forest of the Rio Grande do Norte state were measured and submitted to analytic tests

of allometry ,PERMANOVA and PCA to prove the existence of morphological variations between these populations. The results obtained from the analyses revealed morphological differentiation in the head, hindlimbs, foot and hand digits of the populations from the Caatinga and a Head Width variation on the Atlantic Forest population , supporting the hypothesis that the environmental conditions can favor adaptations according to the ecological habits of the individuals and that may be interference from gene flow to the expression of these morphological variations.

Keywords: Ecomorphology. Domain. Ameivula. Populations.

Introdução

A ecomorfologia é uma área de estudo que busca compreender a relação entre ambiente e morfologia; adicionalmente comportamento como de forrageio, reprodução, locomoção e fuga de um animal também são investigados (Neto, 1995; Feilich & López-Fernández, 2019). Documentar essas variações morfológicas ajudam a entender como o local de vida deste indivíduo está atuando sobre seu corpo e seu comportamento, servindo de margem para previsões de adaptações, com o decorrer do tempo (Aguirre et al., 2002; Bock, 1994).

Trabalhos clássicos evidenciaram que algumas adaptações morfológicas em animais são influenciadas pelo ambiente em que vivem, tornando-se o objeto principal de estudo da ecomorfologia (Darwin, 1859; Van der Klaauw, 1948; Bock, 1989). Essas variações morfológicas são estudadas atualmente com auxílio de técnicas de observação e medidas corporais, para maior robustez de dados analíticos e estatísticos, contribuindo para estudos comparativos de indivíduos que vivem em ambientes diferentes e que proporcionam hábitos de vida distintos, mesmo se tratando da mesma espécie (Pinto & Ávila-Pires, 2004; Furtado, 2023; Losos, 1990).

Na área da herpetologia, trabalhos de ecomorfologia com lagartos comparam principalmente a fitofisionomia em que o indivíduo vive, evidenciando adaptações corporais voltadas ao seu comportamento em relação ao seu hábitat, onde espécies de hábitos terrícolas tendem a ter alargamento da pélvis, alongamento da cauda e quarto artelho do pé (Miles, 1994) e espécies terrícolas presentes em solo arenoso, apresentam um alongamento dos membros posteriores e pés (Vanhooyndonck & Van Damme, 1999; Kohlsdorf et al., 2001).

Segundo Losos e Garland (1994), o tamanho dos membros posteriores são essenciais para seu desempenho locomotor, com o ambiente exercendo uma pressão seletiva nessas adaptações. Esse trabalho evidenciou que indivíduos com membros mais longos são mais velozes em ambientes planos e abertos, enquanto que membros mais curtos favorecem a estabilidade em ambientes fechados e estreitos.

O lagarto Ameivula ocellifera (Spix, 1825) é um representante da família Teiidae com distribuição ampla entre os domínios morfoclimáticos do Nordeste brasileiro (Sales, 2018). Essa espécie é comumente encontrada em domínios de Caatinga, caracterizados pela vegetação arbustiva e herbácea aberta, e solo erodido estável (Andrade et al., 2013; Varela-Freire, 2002) e de Mata Atlântica, que apresenta vegetação arbórea alta e densa

(Dubeux et al., 2022). Dentro do domínio atlântico, está presente a fitofisionomia de Restinga, com vegetação arbustiva rasteira, aberta e solo arenoso fino (Freire, 1996).

Essa diferença de naturezas entre os domínios influencia diretamente no método de forrageio de A. ocellifera, onde as populações inseridas em áreas de Caatinga apresentam comportamento de cavar o substrato em busca de presas sedentárias ou imóveis, utilizando os braços para facilitar o forrageio e a cabeça como uma espécie de pá, e em áreas de Mata Atlântica, onde o folhiço é abundante, há uma predominância de busca visual por presas expostas sob a serrapilheira, sendo dispensável o uso dos braços ou da cabeça (Sales, 2018).

Com base nesse contexto, este trabalho busca analisar e comparar os caracteres morfológicos de populações de A. ocellifera em diferentes fitofisionomias do Nordeste setentrional brasileiro, para verificar se há um aumento significativo no tamanho dos membros e dedos anteriores e/ou posteriores e da cabeça por influência do substrato arenoso instável, que impacta na locomoção do indivíduo, ou comportamento de forrageio que envolve o hábito de cavar, tanto pelo uso de membros anteriores quanto pelo uso da cabeça, como em Vanhooyndonck & Van Damme (1999), Losos & Garland (1994) e Miles (1994).

Metodologia

Foram analisados 86 exemplares adultos de A. ocellifera depositados na Coleção Herpetológica da UFRN, sendo 46 registrados na área de Caatinga e 40 nas áreas de Mata Atlântica. A determinação do sexo desses lagartos foi feita a partir de cortes na base da cauda, com auxílio de um bisturi e uma pinça, para permitir a visualização de ductos do hemipênis em machos e a ausência de ductos em fêmeas (Maciel et al., 1997), contendo um total de 84 machos, 1 fêmea e 1 não poude ser identificado. Com relação a maturidade sexual, indivíduos com Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) > 55 mm foram considerados adultos (Vitt, 1983).

As variáveis selecionadas para o estudo são Comprimento Rostro-Cloacal (CRC); Da ponta do focinho até a abertura da cloaca, Altura da Cabeça (AC); Do ponto ventral mais baixo até o ponto dorsal mais alto da cabeça, Comprimento da Cabeça (CC); Da ponta do focinho até o osso quadrado, Largura da Cabeça (LC); De uma abertura auricular até a outra, Comprimento do Braço (CB); Da axila até o cotovelo, Comprimento do Antebraço (CAB); Do cotovelo até o ponto médio da mão, Comprimento da Coxa (CCX); Da virilha até o ponto distal do joelho, Comprimento da Tíbia (CT); Do ponto distal do joelho até o ponto médio ventral do pé, Comprimento do IV Dedo da mão (IVD); Da inserção do dedo até o extremo da unha, Comprimento do IV Artelho (IVA); Da inserção do dedo até o extremo da unha e Tamanho da Cauda (TC); Da abertura cloacal até a ponta da cauda (Pinto & Ávila-Pires, 2004). As medidas foram feitas com a ajuda de um paquímetro digital (0.01 mm) priorizando o lado esquerdo dos exemplares, com exceção dos que apresentaram membros ou dedos danificados/ausentes.

As variáveis corporais foram submetidas a um teste de crescimento alométrico para observar a taxa de crescimento de membros e cabeça dos indivíduos, tornando a medida de CRC como uma variável independente, com uso de regressões lineares (Huxley & Teisser, 1936). Após isso, os efeitos alométricos foram corrigidos de acordo com o protocolo de Lleonart, Salat & Torres (2000), minimizando o efeito do tamanho corporal sobre as variáveis morfológicas.

Com base nos resultados do teste t de Student (Student, 1908; Bartels et al., 2011), foi possível classificar as relações morfométricas em crescimento isométrico, positivo e negativo. Os valores do coeficiente angular que não diferiram significativamente de 1 ($p > 0,05$), foram considerados como crescimento isométrico. Já os valores que apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$), b superior a 1, foram interpretados como alometria positiva, indicando que a variável cresce proporcionalmente mais rápido que o CRC. Entretanto, valores de b inferiores a 1 caracterizaram alometria negativa, indicando crescimento proporcionalmente mais lento em relação ao CRC. Os valores dos coeficientes angulares foram gerados pelo pacote broom (Robinson et al., 2026) e as tabelas com os coeficientes pelo pacote purr (Wickham & Henry, 2026) .

Foi feita uma análise exploratória para determinar qual tratamento estatístico seria melhor utilizado de acordo com a natureza dos dados, seguindo os procedimentos de Zurr (2010). A partir dos resultados da análise exploratória, o teste de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) foi escolhido e realizado no software R com o pacote vegan (Oksanen et al., 2015), servindo de auxílio para testar possíveis diferenças nas medidas corporais dos exemplares entre as localidades selecionadas (Anderson, 2001). Os dados foram organizados e estruturados com uso dos pacotes dplyr (Wickham et al., 2026) e tibble (Müller & Wickham, 2026), respectivamente.

A ordenação das variáveis morfométricas foi feita com auxílio do Método de Análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (NMDS), para obter uma melhor representação visual entre similaridade e dissimilaridade morfológica dos indivíduos selecionados, gerados pelo pacote vegan (Oksanen et al., 2015). Diante disso, esse protocolo visa organizar as variáveis em um gráfico e levar em consideração as distâncias relativas entre os indivíduos, abordando essas relações em uma dimensão reduzida (Legendre & Legendre, 2012). Com base no valor de stress, foi possível avaliar o grau de diferença entre as distâncias relativas observadas nos dados originais e os dados obtidos pelo NMDS (Kruskal, 1964).

Para a organização dessas variáveis, o método de Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizado para reduzir as dimensões e sintetizar a variação entre as variáveis correlacionadas (Jolliffe & Cadima, 2016). Esse procedimento contribuiu para uma melhor visualização de padrões de similaridade entre os indivíduos e suas populações, transformando os dados originais em componentes principais independentes e os ordenando de acordo com o grau de variância explicada, representando as informações multivariadas em números reduzidos de eixos. Os resultados foram interpretados com base nos loadings, na contribuição das variáveis morfométricas para cada eixo e sua porcentagem de variância explicada.

Gráficos de dispersão foram gerados pelo pacote ggplot2 (Wickham et al., 2026) para a visualização dos resultados morfométricos, em função do logaritmo de CRC. Utilizando o método de mínimos quadrados, uma reta de regressão linear foi criada e refinada para

cada gráfico, juntamente de um intervalo de confiança de 95% e um valor de significância de 5% (= 0,05). Dessa forma, foi possível interpretar a direção e relação das variáveis, a dispersão dos dados e a precisão do modelo linear.

Resultados e Discussões

Resultado da análises alométricas

Os resultados alométricos para a população do domínio da Caatinga (Fig. 1) apresentaram uma alometria positiva nas variáveis de AC ($b = 1,383$; $p < 0,001$) e LC ($b = 1,294$; $p < 0,001$), esses dados comprovam que o crescimento desses fatores não dependem do CRC e podem ultrapassar o índice de crescimento da cabeça do indivíduo, enquanto que na variável de CC ($b = -4,252$; $p = 0,045$), a alometria foi negativa o que indica que o crescimento de CC acompanha o de CRC numa proporção menor. Os outros componentes dessa localidade foram considerados isométricos e acompanham proporcionalmente o crescimento de CRC.

Na população da Mata Atlântica (Fig. 2), apenas a variável de LC ($b = 1,429$; $p = 0,024$) foi considerada positiva, o que resultou num crescimento independente de CRC, enquanto todos os outros componentes apresentaram resultados isométricos, mantendo o crescimento proporcional à CRC.

O Tamanho da Cauda (TC) foi considerado como um dado enviesado por um grande número de exemplares possuírem caudas danificadas, autotomizadas ou que não conseguiram atingir o tamanho normal em casos de regeneração da autotomia.

Com base nos resultados fornecidos pelos cálculos e pela visualização dos gráficos de PCA e alometria, é possível inferir que a população de Ameivula ocellifera (Spix, 1825) inserida na Caatinga apresenta indivíduos com uma variabilidade de morfotipo maior do que os indivíduos presentes na Mata Atlântica. Apesar da sobreposição presente nos gráficos de PCA, indicando semelhança morfológica entre as duas populações, houve uma diferença significativa entre as variáveis de IV Artelho (IVA), IV dedo da mão (IVD), Comprimento da Coxa (CCX), Altura da Cabeça (AC), Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) e Comprimento da Tíbia (CT).

Resultado da Análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS)

O gráfico de NMDS (Fig. 5) mostrou uma reorganização das dimensões variáveis dos indivíduos, com um valor de 0.145 de Stress, sendo considerado como um bom valor de interpretação (Kruskal, 1964). A elipse vermelha, representando os indivíduos do domínio de Caatinga, tem uma área consideravelmente maior e abrange boa parte dos dados de dimensionalidade, ainda com alguns componentes bem dispersos e grande quantidade na parte superior do eixo, enquanto a elipse verde, indivíduos do domínio Atlântico, possuíram uma distribuição mais concentrada na região superior do gráfico, ainda apresentando poucos dados distribuídos ao longo dos eixos. Com base no gráfico, é possível afirmar que esse padrão indica diferenças entre a morfologia entre os

domínios selecionados, sugerindo que há uma associação entre as condições naturais dos ambientes e as características morfológicas das populações.

Análises PCA

Os resultados obtidos mostraram que a PCA explicou 35,2% da variação morfológica dos indivíduos adultos de A. ocellifera, sendo PC1 de 20,8% e PC2 de 14,4% (Fig. 6).

Os componentes de PC1 dos adultos foram influenciados pelas variáveis de Altura da Cabeça (AC), Comprimento Rostro-Cloacal (CRC), Largura da Cabeça (LC) e Comprimento do Antebraço (CAB) por estarem mais à direita do eixo, tendo AC e CRC como os mais distantes. Por apresentarem uma proximidade e um paralelismo entre as setas, as 2 variáveis AC e CRC estão intrinsecamente relacionadas e contribuem positivamente para seu eixo, mesmo que LC e CAB estejam na mesma direção e sejam próximas entre si, sua contribuição é relativamente menor para os outros componentes. Essas variáveis indicam que os indivíduos analisados possuem valores relativamente maiores das respectivas medidas.

Os componentes de PC2 tiveram influência das variáveis de Comprimento da Coxa (CCX), IV Dedo da Mão (IVD), Comprimento da Cabeça (CC) e Tamanho da Cauda (TC) por causa da sua localização na esquerda do eixo e acima de 0, enquanto o Comprimento da Tíbia (CT), contribuiu negativamente para as variáveis. As variáveis citadas também possuíram um grau de aproximação e paralelismo significativo, indicando forte correlação entre elas.

A elipse vermelha mostra a dispersão dos dados entre os adultos e tem um formato mais arredondado, com os indivíduos da Caatinga bem distribuídos ao longo da elipse, indicando que nessa localidade, há uma diferenciação morfológica ampla entre indivíduos dessa população. Na elipse verde, os lagartos da Mata Atlântica estão presentes em uma forma mais diagonal, o que representa uma variação direcionada, mas ainda tendo indivíduos que são próximos morfologicamente entre si. Apesar da variação da população de Caatinga, boa parte dos lagartos analisados se sobrepõem na região da elipse da Mata Atlântica, indicando que mesmo em diferentes domínios morfoclimáticos, essas populações apresentam um morfotipo semelhante.

Com base nos resultados fornecidos pelos cálculos e pela visualização dos gráficos de PCA e alometria, é possível inferir que a população de Ameivula ocellifera (Spix, 1825) inserida na Caatinga apresenta indivíduos com uma variabilidade de morfotipo maior do que os indivíduos presentes na Mata Atlântica. Apesar da sobreposição presente nos gráficos de PCA, indicando semelhança morfológica entre as duas populações, houve uma diferença significativa entre as variáveis de IV Artelho (IVA), IV dedo da mão (IVD), Comprimento da Coxa (CCX), Altura da Cabeça (AC), Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) e Comprimento da Tíbia (CT).

Essas variações encontradas podem evidenciar possíveis adaptações ao solo da Caatinga, visto que as populações inseridas neste domínio apresentam o hábito de cavar o substrato em busca de pequenos invertebrados sedentários enterrados, tanto com uso dos membros dianteiros quanto com a cabeça, em oposição à população da Mata Atlântica, que se beneficia da busca visual, reduzindo a necessidade de uso da cabeça e braços para forrageio (Sales, 2018).

Inicialmente, era esperado que a população presente na Mata Atlântica possuísse um alongamento de pernas, tíbias e dedos do pé por influência da instabilidade do solo arenoso, para favorecer a sua locomoção (Vanhooyndonck & Van Damme, 1999; Kohlsdorf et al., 2001; Furtado, 2023). Entretanto, os indivíduos da Caatinga apresentaram um aumento das medidas corporais referentes aos membros posteriores. Esses dados podem inferir que essas alterações morfológicas podem ser mais impactadas por questões filogenéticas, e que a paisagem do ambiente ajude na expressão de determinados genes (Toyama, 2017; Sanger et al., 2011).

A população do domínio atlântico se mostrou mais conservada morfologicamente do que a população da Caatinga, conforme os gráficos de PCA, podendo ter relação direta com o fluxo gênico dessas populações (Oliveira et al., 2018). Na Mata Atlântica nordestina, apesar da grande fragmentação, a presença de áreas de contato naturais ao longo da região costeira permite uma interação direta entre essas espécies e mantém uma homogeneidade genética para as populações inseridas neste domínio, o que pode facilitar a introdução de variantes genéticas e diminuir a diferenciação morfológica. Enquanto na Caatinga, por ser um bioma exclusivo do Brasil e mais delimitado por barreiras naturais que a Mata Atlântica (Velloso, 2002), suas populações tendem a ter um contato maior entre si, o que pode resultar na perda de variabilidade genética e favorecer a expressão genética de determinados alelos que antes não estavam sendo expressados.

Conclusão

As populações de Ameivula ocellifera do domínio da Caatingaestão apresentando diferenciação morfológica, seja pelo comportamento de cavar durante o forrageio, pela diversidade de elementos presentes nesta fitofisionomia ou por fatores de fluxo genético mediante às barreiras naturais.

Os lagartos existentes no domínio atlântico tiveram caracteres morfológicos mais conservados em relação aos da Caatinga, podendo estar relacionado com fatores filogenéticos. Análises sobre granulometria do solo ou uma melhor seleção de micro-habitats de cada domínio poderiam dar mais embasamento aos dados obtidos e poderiam contribuir para uma maior robustez nas hipóteses de locomoção e uso de substrato.

Ainda são necessários estudos com um número maior de fêmeas, para uma melhor avaliação dessas diferenças e poder afirmar que elas também ocorrem em indivíduos da Caatinga, e estudos envolvendo genética, para uma compreensão da expressão gênica de ambas as populações e considerar que variações nos alelos podem estar ligadas às diferenças morfológicas.

A presença dessas variações pode ajudar futuramente em trabalhos de comportamento e filogenia para considerar essas adaptações como precursoras de uma nova espécie de Ameivula na Caatinga nordestina. Seguindo o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) de número 15; de vida e ecossistemas terrestres, é fundamental a preservação e o estudo dessas populações.

Referências

Aguirre, L. F., A. Herrel, R. Van Damme, and E. Matthysen. 2002. Ecomorphological analysis of trophic niche partitioning in a tropical savannah bat community. Proceedings of the Royal Society of London B 269: 1271–1278.

Andrade, M. J. M., Sales, R. F. D., Freire, E. M. X. 2013. Ecology and diversity of a lizard community in the semiarid region of Brazil. Biota Neotrop. 13, 199–209. https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000300023

Bartels, P. J., Nelson, D. R., Exline, R. P. Allometry and the removal of body size effects in the morphometric analysis of tardigrades. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, v. 49, supl. 1, p. 17–25, 2011. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2010.00593.x.

Bock, W.J. Concepts and methods in ecomorphology. J. Biosci. 19, 403–413 (1994). https://doi.org/10.1007/BF02703177.

Bock, Walter J. From Biologische Anatomie to Ecomorphology. Netherlands Journal of Zoology, v. 40, n. 1–2, p. 254–277, 1989. DOI: 10.1163/156854289X00291.

Darwin, C.; The Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London: John Murray, 1859

Dubeux, M .J. M.; Araújo Neto, J. V. Tiburcio, I. C. S.; LISBOA, B. S.; Torquato, S.; Freitas, M. A.; Freire, E. M. X.; Guarnieiri, M. C.; Mott, T. A “hotspot” within a hotspot: the reptiles of the Estação Ecológica and Área de Proteção Ambiental de Murici, Atlantic Forest of northeastern Brazil. Biota Neotropica, Campinas, v. 22, n. 2, e20221337, 2022. Disponível em:https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2022-1337.

Freire, E. M. X., 1996. Estudo ecológico e zoogeográfico sobre a fauna de lagartos (Sauria) das dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraíba, Brasil. Rev. Bras. Zool. 13, 903–921. https://doi.org/10.1590/s0101-81751996000400012

Furtado, O. S., 2023. Ecologia comparativa e ecomorfologia de espécies de Gymnodactylus (Squamata: Phyllodactylidae) em áreas de Mata Atlântica e Caatinga de região setentrional do Nordeste brasileiro. 2023. p. 54–73. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

Garland, T., Losos, J. B., 1994. Ecological morphology of locomotor performance in squamate reptiles, in: Ecological Morphology: Integrative Organismal Biology. pp. 240–302.

Huxley, J., Teissier, G. Terminology of Relative Growth. Nature 137, 780–781 (1936). https://doi.org/10.1038/137780b0

Klingenberg, C.P. (2011) MORPHO J: an integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources, 11 (2), 353–357. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x

Kruskal, J. B. (1964). Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. Psychometrika, 29(2), 115–129. DOI: 10.1007/BF02289694.

Feilich, K. L., López-Fernández, H., When Does Form Reflect Function? Acknowledging and Supporting Ecomorphological Assumptions, Integrative and Comparative Biology, Volume 59, Issue 2, August 2019, Pages 358–370, https://doi.org/10.1093/icb/icz070

Kohlsdorf, T., Garland, T., Navas, C.A., 2001. Limb and Tail Lengths in Relation to Substrate Usage in Tropidurus Lizards. J. Morphol. 248, 151–164.

Leal, I. R., Silva, J. M. C., Tabarelli, M. & Lacher, T. E., Junior. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. Megadiversidade 1:139-146.

Lleonart, J.; Salat, J.; Torres, G. J. Removing allometric effects of body size in morphological analysis. Journal of Theoretical Biology, v. 205, n. 1, p. 85–93, 2000.

Lisboa, C. M. C. A. Diversidade e distribuição espacial dos Squamata do Parque Estadual das Dunas do Natal-RN: avaliação pretérita e atual. Monografia UFRN. Natal. 27p, 2005.

Losos, J. B., 1990. The Evolution of Form and Function: Morphology and Locomotor Performance in West Indian Anolis Lizards. Evolution. 44, 1189–1203.

Maciel, É. S., Z., R., Almeida-Santos, S. M. (2024). Male genital system of Ameiva ameiva (Squamata: Teiidae). The Anatomical Record, 307(11), 3596–3605.https://doi.org/10.1002/ar.25463

Miles, D. B., 1994. Covariation between morphology and locomotory performance in Scleropine lizards. In: Vitt, L. J., Pianka, E. R. (eds) Lizard Ecology. Historical and Experimental Perspectives, 207–235. Princeton University Press, Princeton.

Müller, K.; Wickham, H. tibble: Simple Data Frames. R package version 3.3.1, 2026.

Oksanen, J.; Simpson, G. L.; Blanchet, F. G.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P. R.; et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.8-0, 2026.

Oliveira, E.F., Martinez, P.A., São-Pedro, V.A. et al. Climatic suitability, isolation by distance and river resistance explain genetic variation in a Brazilian whiptail lizard. Heredity 120, 251–265 (2018). https://doi.org/10.1038/s41437-017-0017-2

Peres-Neto, P. R., 1995. Introdução a análises morfométricas. Oecologia Brasiliensis, ISSN 1981-9366, Vol. 2, Nº. 1, 1995 (Ejemplar dedicado a: Tópicos em tratamento de dados biológicos). 02. 10.4257/oeco.1995.0201.03.

Pinto, G. S., Ávila-Pires, T. C. S., 2004. Crescimento alométrico, morfologia e uso do habitat em cinco espécies de Mabuya Fitzinger (Reptilia, Scincidae). Rev. Bras. Zool. 21, 161–168. https://doi.org/10.1590/s0101-81752004000200001

R core team.R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2026. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: 2 ago. 2026.

Sales, Raul Fernandes Dantas de. Ecologia comportamental do lagarto Ameivula ocellifera (Squamata: Teiidae) em diferentes fitofisionomias do nordeste do Brasil. 2018. 137f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

Sanger, Thomas & Mahler, D. Luke & Abzhanov, Arhat & Losos, Jonathan. (2011). Roles for modularity and constraint in the evolution of cranial diversity among Anolis lizards: Anolis skull shape and modularity. Evolution. 66. 1525-1542. 10.1111/j.1558-5646.2011.01519.x.

Student. The probable error of a mean. Biometrika, v. 6, n. 1, p. 1–25, 1908. DOI: 10.1093/biomet/6.1.1.

Toyama, K.S., 2017. Interaction Between Morphology and Habitat Use: A Large-Scale Approach in Tropidurinae Lizards. Breviora 554, 1-20. https://doi.org/10.3099/0006-9698-554.1.1

Van Der Klaauw, C. J. Ecological studies and reviews. IV. Ecological morphology. Bibliotheca Biotheoretica, v. 4, p. 27–111, 1948.

Vanhooydonck, B., Damme, R. Van, 1999. Evolutionary relationships between body shape and habitat use in lacertid lizards. Evol. Ecol. Res. 1, 785–805.

Varela-Freire, A. A. 2002. A Caatinga Hiperxerófila do Seridó: a sua Caracterização e Estratégias para sua Conservação. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, São Paulo.

Velloso, A. L.; Sampaio, E. V. S. B.; Pareyn, F. G. C. (org.). Ecorregiões: propostas para o bioma Caatinga. Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 2002. 76 p.

Wickham, H.; François, R.; Henry, L.; Müller, K.; Vaughan, D. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.2.1, 2026.

Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer.

Wickham, H.; Henry, L. purrr: Functional Programming Tools. R package version 1.2.2, 2026.

Zuur, A.F., Ieno, E.N. and Elphick, C.S. (2010), A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. Methods in Ecology and Evolution, 1: 3-14. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x.

Anexos



Figura 1- Gráfico de crescimento alométrico de Ameivula ocellifera (Caatinga)



Figura 2- Gráfico de crescimento alométrico de Ameivula ocellifera (Mata Atlântica)



Figura 3 - Tabela de crescimento alométrico de Ameivula ocellifera (Caatinga)



Figura 4 - Tabela de alometria de Ameivula ocellifera (Mata Atlântica)



Figura 5 - Gráfico de dispersão de Análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico



Figura 7 - Tabela de medidas de Ameivula ocellifera (Caatinga)



Figura 8 - Tabela de medidas de Ameivula ocellifera (Mata Atlântica)

CÓDIGO: SB1572

AUTOR: SARAH ALVES DE MEDEIROS

ORIENTADOR: RENATA ANTONACI GAMA

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA FLUOXETINA NO DESENVOLVIMENTO DE Cochliomyia macellaria E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NA ESTIMATIVA DO INTERVALO Post Mortem (IPM).

Resumo

O presente trabalho investigou os efeitos da fluoxetina sobre o desenvolvimento de larvas da espécie Cochliomyia macellaria. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Insetos e Vetores, utilizando dietas artificiais contendo o fármaco, com o objetivo de simular concentrações potencialmente detectáveis em contextos forenses. Foram avaliados parâmetros relacionados ao desenvolvimento larval, incluindo tempo de desenvolvimento e sobrevivência. Foram avaliadas três condições experimentais: controle e duas diferentes quantidades de fluoxetina adicionadas ao substrato alimentar, cada uma com três réplicas contendo 30 ovos.

No grupo controle, as larvas passaram pelos estádios L1, L2 e L3 seguidos pela formação de pupas e emergência dos adultos, com tempo médio de desenvolvimento de 10,3 dias e registro de 35 adultos ao final do experimento. No grupo com menor concentração de fluoxetina, também houve progressão até a fase adulta, porém, com tempo médio de desenvolvimento de 11,5 dias, sendo registrados 8 adultos ao final do experimento. Já no grupo com maior concentração, observou-se mortalidade precoce, com os indivíduos atingindo, no máximo, o terceiro estádio larval (L3), sem formação de pupas ou emergência de adultos. Assim, os resultados sugerem que a fluoxetina pode interferir no desenvolvimento de C. macellaria, principalmente na maior quantidade avaliada, reforçando a importância de considerar a presença de fármacos em estudos relacionados à estimativa do IPM.

Palavras-chave: Entomotoxicologia Forense; Fluoxetina; IPM; Cochliomyia macellaria.

TITLE: EVALUATION OF FLUOXETINE ON THE DEVELOPMENT OF Cochliomyia macellaria AND POSSIBLE IMPLICATIONS FOR Post Mortem INTERVAL (PMI) ESTIMATION.

Abstract

This study investigated the effects of fluoxetine on the development of Cochliomyia macellaria larvae. The trials were conducted at the Laboratory of Insects and Vectors using artificial diets containing the drug to simulate concentrations potentially detectable in forensic contexts. Larval development parameters were evaluated, including development time and survival rate. Three experimental conditions were tested: a control group and two different concentrations of fluoxetine added to the food substrate, each with three replicates containing 30 eggs.

In the control group, larvae progressed through the L1, L2, and L3 instars, followed by pupation and adult emergence, with an average development time of 10,3 days and a total of 35 adults recorded by the end of the experiment. In the group treated with the lower concentration of fluoxetine, progression to the adult stage also occurred; however, the average development time was 11,5 days, with 8 adults recorded at the end of the experiment. In contrast, the group treated with the higher concentration of fluoxetine exhibited early mortality, with individuals reaching at most the third larval instar (L3), with no pupation or adult emergence. Therefore, the results suggest that fluoxetine can interfere with the development of C. macellaria, particularly at the higher concentration evaluated, reinforcing the importance of considering the presence of pharmaceuticals in studies related to PMI estimation.

Keywords: Forensic Entomotoxicology; Fluoxetine; PMI; Cochliomyia macellaria.

Introdução

A estimativa do intervalo pós-morte (IPM) constitui uma das etapas fundamentais das investigações médico-legais, uma vez que fornece informações importantes para a reconstrução dos acontecimentos relacionados a uma morte. Nas primeiras horas após o óbito, alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas do cadáver podem ser utilizadas para essa estimativa. Entretanto, à medida que o processo de decomposição avança, esses parâmetros tornam-se progressivamente menos precisos, fazendo com que a entomologia forense assuma maior importância na determinação do IPM mínimo, especialmente por meio da análise dos insetos que colonizam o cadáver (THUMMEL et al., 2023).

A estimativa entomológica baseia-se principalmente na identificação das espécies presentes e na determinação da idade dos estágios imaturos, considerando seus padrões

de desenvolvimento e a sucessão de espécies ao longo da decomposição. Entretanto, o desenvolvimento dos insetos pode ser influenciado por diferentes condições ambientais e pela presença de substâncias químicas no cadáver. Temperatura, umidade, características do substrato e composição química dos tecidos são alguns dos fatores capazes de modificar o desenvolvimento larval e, consequentemente, interferir na estimativa do IPM (THUMMEL et al., 2023).

Nesse contexto, a entomotoxicologia forense constitui uma importante área de investigação, por abordar a interação entre substâncias químicas presentes em restos cadavéricos e os organismos utilizados nas análises entomológicas. Fármacos, drogas de abuso e outros compostos podem ser incorporados pelos insetos durante a alimentação e provocar alterações fisiológicas e comportamentais, especialmente durante as fases imaturas. Essas alterações podem modificar parâmetros utilizados na estimativa do IPM e representar uma fonte adicional de incerteza para a interpretação das evidências entomológicas (AMENDT et al., 2004).

Entre as substâncias de interesse nesse contexto estão os antidepressivos, cuja utilização tem aumentado no Brasil. Entre esses medicamentos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), classe à qual pertence a fluoxetina, destacaram-se como a categoria de antidepressivos mais comercializada no país entre 2014 e 2019 (HOEFLER et al., 2022). A presença desses compostos no organismo no momento da morte levanta a possibilidade de sua transferência para os tecidos cadavéricos e posterior exposição dos insetos durante o processo de colonização e alimentação.

A fluoxetina apresenta características farmacológicas que favorecem sua distribuição pelo organismo e sua presença em diferentes tecidos, tornando relevante investigar sua interação com organismos necrófagos (HOFFMAN et al., 2007). Estudos experimentais demonstram que a fluoxetina pode ser incorporada por insetos de importância forense quando presente no substrato alimentar. O composto foi detectado em diferentes estágios de desenvolvimento de Lucilia sericata e Sarcophaga crassipalpis, após exposição a tecido contendo o fármaco (ZANETTI et al., 2019). Além disso, estudos com Calliphora vicina demonstraram alterações em parâmetros do desenvolvimento larval após exposição à fluoxetina, incluindo peso, tamanho e graus-hora acumulados (DIAS, 2014). Dessa forma, a presença desses compostos pode representar um fator capaz de interferir nos parâmetros utilizados para estimar o IPM.

Considerando essa problemática, o presente trabalho teve como objetivo investigar a influência da fluoxetina sobre a sobrevivência e desenvolvimento de Cochliomyia macellaria, espécie de importância para estudos entomológicos e forenses. Para isso, foram realizados ensaios laboratoriais utilizando dietas artificiais contendo o fármaco, permitindo avaliar a resposta das larvas à exposição à fluoxetina. Foram analisados parâmetros relacionados ao desenvolvimento e sobrevivência larval.

Metodologia

Preparação das dietas com Fluoxetina:

As concentrações de fluoxetina utilizadas nos tratamentos experimentais foram definidas com base nas doses empregadas no tratamento clínico, utilizando como referência valores de administração terapêutica do fármaco.

A dieta do grupo tratado foi preparada com comprimidos de cloridrato de fluoxetina (Daforin®, EMS). Foram testadas duas concentrações, de 40 mg e 20 mg, onde foram colocados dois comprimidos e um comprimido, respectivamente, em 35 g de ração do sachê Pedigree High Protein sabor carne e frango, macerados com auxílio de um pilão e diluídos em 10 ml de água.

Para o grupo controle, foi usado apenas 35g de ração do sachê Pedigree High Protein sabor carne e frango, e 10ml de água.

Separação dos ovos e realização do bioensaio:

Para os ensaios foram utilizados ovos da geração F13 da colônia de Cochliomyia macellaria estabelecida e mantida em condições controladas de temperatura (27–30 °C), umidade (60–75%) e fotoperíodo (12:12 h - luz:escuro) no insetário do Laboratório de Insetos e Vetores da UFRN. Foram estabelecidas três condições experimentais: grupo controle, sem adição de fluoxetina à dieta, e dois grupos experimentais contendo diferentes quantidades do fármaco. Cada condição foi avaliada em triplicata, totalizando nove unidades experimentais. Em cada unidade foram adicionados 30 ovos de C. macellaria, totalizando 90 ovos por condição e 270 ovos no experimento. Após o preparo das dietas e adição dos ovos, cada pote foi colocado em um recipiente maior contendo areia higiênica de gato, para facilitar a migração e pupação das larvas, e estes recipientes foram fechados com voal e liga, para evitar a fuga das larvas, e acondicionados no insetário para a observação diária até a emergência dos adultos.

Como parâmetros de avaliação foram utilizados a duração total do ciclo de vida, duração de cada estágio de desenvolvimento, mortalidade, peso médio das pupas e alterações morfológicas.

Resultados e Discussões

Em todas as condições avaliadas, ocorreu a eclosão de larvas no primeiro dia do experimento. Entretanto, como não foram quantificadas diariamente em cada unidade experimental, não foi possível determinar a taxa de eclosão ou a sobrevivência larval a partir do número inicial de ovos. Nos grupos controle, o CT1 apresentou indivíduos no quarto dia, com redução gradual até sete indivíduos no décimo terceiro dia. O CT2 apresentou 22 indivíduos no quarto dia, mantendo essa quantidade até o décimo segundo dia e apresentando 20 indivíduos no décimo terceiro dia. No CT3, foram observados oito indivíduos durante todo o período avaliado. Apesar da variação entre as réplicas, todas as unidades do grupo controle apresentaram progressão até a fase adulta.

Nos grupos controle, a primeira pupação foi observada entre o quinto e o sexto dia do experimento, enquanto a primeira emergência de adultos ocorreu entre o décimo e o

décimo primeiro dia. O tempo médio até a primeira emergência foi de 10,3 dias, considerando as três réplicas controle. Esses resultados demonstram que, apesar da diferença no número de indivíduos entre as réplicas, o desenvolvimento até a fase adulta ocorreu em todas as unidades experimentais (Tabela 1).

Nos grupos submetidos à concentração de 40 mg de fluoxetina, observou-se uma redução acentuada na sobrevivência a partir do 4º dia. Nas réplicas T1 e T3, nenhum indivíduo foi registrado durante esse período, enquanto T2 apresentou apenas um indivíduo entre o quarto e o oitavo dia, não sendo mais observado a partir do nono dia. Nenhuma das três réplicas atingiu a fase de pupa ou adulto.

Nos grupos submetidos à menor concentração de fluoxetina, também foi observado um menor número de emergência em relação ao controle, porém houve progressão do desenvolvimento. Em uma das réplicas (T4) foram observados três indivíduos no quarto dia, com redução para dois no quinto dia e um indivíduo ao final do acompanhamento. A réplica T5 apresentou seis indivíduos entre o quarto e o décimo terceiro dia, sem alteração no número de indivíduos durante o período observado. Em T6, foram observados dois indivíduos inicialmente com redução para um indivíduo a partir do 6º e ausência de indivíduos ao final do acompanhamento.

A primeira pupação ocorreu entre o quinto e o sexto dia nas três réplicas. A emergência de adultos ocorreu no 13º dia em T4 e no décimo dia em T5, enquanto em T6 não houve emergência de adultos. Considerando apenas as duas réplicas em que houve emergência, o tempo médio até a primeira emergência foi de 11,5 dias, em comparação a 10,3 dias no grupo controle.

Comparativamente, os resultados demonstraram maior mortalidade nos grupos expostos à concentração de 40 mg de fluoxetina. Enquanto os grupos controle apresentaram sobrevivência e progressão normal entre os estágios de desenvolvimento, os grupos tratados com 40 mg apresentaram mortalidade dos indivíduos e ausência de progressão para os estágios subsequentes. A concentração de 20 mg apresentou um comportamento intermediário, com sobrevivência de parte dos indivíduos e progressão para o estágio pupal, embora tenham sido observadas alterações no tempo de desenvolvimento e mortalidade de indivíduos ao longo do experimento.

De modo geral, os resultados obtidos sugerem que a exposição à fluoxetina pode interferir nos parâmetros biológicos de C. macellaria, com efeitos mais acentuados na maior concentração. Enquanto todas as réplicas controle completaram o desenvolvimento até a fase adulta, nenhuma das unidades submetidas à maior exposição atingiu a fase pupal. Na menor exposição, houve progressão até a fase pupal nas três réplicas e emergência de adultos em duas delas.

Conclusão

Os resultados sugerem que a exposição à fluoxetina pode interferir no desenvolvimento de Cochliomyia macellaria, principalmente na maior concentração avaliada, na qual os

insetos não atingiram as fases de pupa e adulto. Na menor exposição, houve formação de pupas e emergência de adultos, embora com variação entre as réplicas.

Esses resultados mostram a importância de considerar a presença de fármacos em estudos de entomologia forense, pois alterações no desenvolvimento dos insetos podem influenciar os parâmetros utilizados na estimativa do intervalo pós-morte. Novos estudos, com diferentes concentrações e maior número de réplicas, são necessários para compreender melhor os efeitos da fluoxetina sobre a espécie.

Referências

HOFFMAN, R. S. et al. The distribution of fluoxetine in human fluids and tissues. Journal of Analytical Toxicology, v. 31, n. 7, p. 409–412, 2007. DOI: 10.1093/jat/31.7.409.

HOEFLER, R. et al. Trends in Brazilian market of antidepressants: a five-year dataset analysis. Journal of Pharmaceutical Policy and Practice, v. 15, 2022.

AMENDT, J., Krettek, R., & Zehner, R. (2004). Forensic entomology. Naturwissenschaften, 91(2), 51-65.

DIAS, Isa Manuela Elias. Efeito da fluoxetina no desenvolvimento de formas imaturas de Calliphora vicina (Diptera: Calliphoridae). 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses) – Instituto Universitário de Ciências da Saúde, CESPU, Gandra, Portugal, 2014.

ZANETTI, Noelia I.; FERRERO, Adriana A.; CENTENO, Néstor D. The use of two fly species to detect the anti-depressant fluoxetine post-mortem (Diptera: Calliphoridae: Lucilia sericata Meigen, Sarcophagidae: Sarcophaga crassipalpis Macquart). Entomologica Americana, New York, v. 125, n. 1–4, p. 4–9, 2019. DOI: 10.1664/1947-5136-125.1.4.

THÜMMEL, Luise; LUTZ, Lena; GEISSENBERGER, Janine; PITTNER, Stefan; HEIMER, Jonathan; AMENDT, Jens. Decomposition and insect succession of pig cadavers in tents versus outdoors: a preliminary study. Forensic Science International, Amsterdam, v. 346, p. 111640, 2023. DOI: 10.1016/j.forsciint.2023.111640.

Anexos



Tabela 1: Parâmetros de desenvolvimento de Cochliomyia macellaria nas diferentes condições experimentais de exposição à fluoxetina.

CÓDIGO: SB1580

AUTOR: GABRIELLE GUILHERMINA FERREIRA DE CARVALHO

ORIENTADOR: JULIANA DEO DIAS

TÍTULO: Na luz ou na escuridão: onde a taxa de eclosão de ovos de resistência do zooplâncton é maior?

Resumo

Ambientes aquáticos subterrâneos do semiárido brasileiro permanecem pouco estudados quanto à dinâmica de bancos de ovos de resistência do zooplâncton, apesar de a luz ser reconhecida como um dos principais gatilhos de eclosão dessas formas dormentes. Neste estudo, avaliou-se experimentalmente se a taxa de eclosão varia entre um tratamento com fotoperíodo (12 h de luz/12 h de escuro) e escuridão constante, em sedimentos de cinco ambientes aquáticos subterrâneos de penumbra do semiárido potiguar (Baraúna e Felipe Guerra, RN), monitorados por 189 dias. Foram registradas 1.183 eclosões distribuídas em 12 táxons, das quais a quase totalidade e 11 dos 12 táxons ocorreu sob fotoperíodo, enquanto a escuridão constante restringiu a eclosão a apenas 3 táxons e a um único evento pontual, além de retardar seu início em cerca de três meses. O teste de Wilcoxon pareado indicou diferença entre tratamentos ($p = 0,0625$), reflexo do reduzido número de réplicas, ainda que o padrão biológico tenha se repetido em 100% dos ambientes amostrados. Houve também variação espacial acentuada entre os locais, com destaque para o cladóceroCoronatella sp., responsável por mais da metade dos organismos eclodidos. Os resultados reforçam o papel da luz como gatilho ambiental relevante para a eclosão do zooplâncton dormente e evidenciam o banco de ovos de resistência como memória biológica e reservatório de espécies em ambientes subterrâneos de baixa luminosidade.

Palavras-chave: ovos de resistência,gatilhos ambientais,dormência,ambientes cársticos.

TITLE: In the Light or in the Dark: Where is the Hatching Rate of Zooplankton Resting Eggs Higher?

Abstract

Underground aquatic environments in the Brazilian semiarid region remain poorly studied regarding the dynamics of zooplankton resting egg banks, despite light being recognized as one of the main hatching triggers for these dormant forms. In this study, it was experimentally evaluated whether the hatching rate varies between a photoperiod treatment (12 h light/12 h dark) and constant darkness, in sediments from five

subterranean aquatic environments with penumbra in the Potiguar semiarid region (Baraúna and Felipe Guerra, RN), monitored for 189 days. A total of 1,183 hatchings distributed across 12 taxa were recorded, of which almost all and 11 out of the 12 taxa occurred under the photoperiod, whereas constant darkness restricted hatching to only 3 taxa and a single isolated event, in addition to delaying its onset by about three months. The paired Wilcoxon test indicated a difference between treatments ($p = 0.0625$), reflecting the reduced number of replicates, even though the biological pattern was repeated in 100% of the sampled environments. There was also pronounced spatial variation among the sites, highlighted by the cladoceran Coronatella sp., which accounted for more than half of the hatched organisms. The results reinforce the role of light as a relevant environmental trigger for the hatching of dormant zooplankton and highlight the resting egg bank as a biological memory and species reservoir in low-light subterranean environments.

Keywords: Resting eggs, environmental triggers, dormancy, karst environments.

Introdução

O estado do Rio Grande do Norte (RN) ocupa o 4º lugar em número de cavernas no Brasil, com 1.424 cavidades catalogadas, presentes principalmente em rochas calcárias de clima semiárido e bioma Caatinga (ICMBIO, 2025).No interior dessas cavidades, é comum a ocorrência de corpos d'água subterrâneos, sendo lagos, poças e riachos que se formam a partir da infiltração e do acúmulo de água nas rochas, os quais constituem verdadeiros ecossistemas aquáticos isolados da superfície.Osambientes aquáticos subterrâneos tendem a apresentar baixa luminosidade ou serem completamente afóticos e, por não possuírem organismos fotoautotróficos, dependem quase exclusivamente da entrada alóctone de matéria orgânica, transportada por agentes físicos como água e vento, ou por animais, na forma de fezes e carcaças (Trajano, 2000; Ferreira et al., 2007). Ainda que a água doce não congelada do planeta esteja armazenada majoritariamente em aquíferos e outros compartimentos subterrâneos, esses ambientes seguem entre os menos estudados, e a fauna subterrânea responde por apenas 8% do total de espécies dulcícolas atualmente catalogadas (Gibert et al., 1994; Fišer et al., 2014).

O zooplâncton é composto por organismos heterotróficos aquáticos de pequeno porte que vivem em suspensão na coluna d'água, com capacidade limitada de deslocamento ativo frente às correntes. Esse grupo reúne táxons bastante diversos como rotíferos, cladóceros, copépodes e amebas testáceas, que variam em tamanho, estratégia alimentar e ciclo de vida, e são elo entre produtores primários e níveis tróficos superiores, sustentando parte significativa da cadeia alimentar aquática (Litchman et al., 2013). Diante de condições adversas,como mudanças de temperatura, falta de alimento, longos períodos de seca, entre outros, muitas espécies produzem formas de resistência, ovos de dormência ou estágios de metabolismo reduzido que se acumulam no sedimento (Brendonck & De Meester, 2003). Esses bancos de formas dormentes funcionam como memória biológica da comunidade, sustentando a recolonização após distúrbios naturais ou antrópicos (Brendonck, 2017; Fontaneto, 2019). Entre os fatores que regulam a eclosão dessas formas dormentes, a luminosidade figura como um dos gatilhos mais consistentemente documentados na literatura (Gyllström & Hansson, 2004; Cáceres & Schwalbach, 2001).Como os ambientes cavernícolas apresentam luminosidade reduzida

ou completamente ausente, permanece pouco compreendido se e em que medida esse gatilho continua a operar em bancos de ovos formados sob condições de baixa luz.

Neste estudo, foi avaliado se a taxa de eclosão de formas dormentes do zooplâncton e a riqueza de táxonsvariam entre tratamentos com fotoperíodo de12 h de luz / 12 h de escuro e 24 h de escuridão. Para isso, foi realizado um experimento em laboratório a partir de sedimento amostrado em ambientes aquáticos subterrâneos do semiárido potiguar. Espera-se que o número de eclosões e a riqueza de táxons seja maior no tratamento com fotoperíodo de 12 h de luz / 12 h de escuro do que no tratamento em 24 h de escuridão, uma vez que a luz atua como gatilho fisiológico primário para a quebra de dormência em zooplâncton, favorecendo também a disponibilidade de recursos alimentares, como microalgas.

Metodologia

A coleta do sedimento para a realização do experimento foi realizada em cinco ambientes aquáticos subterrâneos do semiárido do Rio Grande do Norte,sendo a Gruta dos Crotes (CRO) e a Gruta Zé de Juvino (ZEJ), localizadas no município de Baraúna, e a Gruta Olho d'água do Cedro (ODC), a caverna Olho d'água da Furna (ODF) e a Gruta do Poço Feio (PFE), localizadas no município de Felipe Guerra. Esses ambientes correspondem a ambientes aquáticos subterrâneos, sujeitos a variações sazonais de nível em função do regime de chuvas do semiárido. A escolha desses cinco locais deveu-se à sua classificação como ambientes de penumbra (twilight), conforme categorização estabelecida por Puppin-Gonçalves et al. (2026), com base na disponibilidade de luz nos sistemas subterrâneos do mesmo domínio geográfico, um nível intermediário de luminosidade, distinto tanto de zonas completamente afóticas, onde a luz solar não penetra, quanto de zonas fóticas, próximos à entrada das cavidades e expostos à luz direta.

O sedimento foi coletadoem cada ambienteaquático subterrâneo com amostrador tubular de PVC (75 mm × 100 mm; ~442 cm^3 por subamostra). O material coletado foi seco em temperatura ambiente e protegido da luz para simular uma seca no ambiente. Após estar completamente seco, o sedimento foi peneirado e distribuído 100 g em recipientes plásticos de 500 mL, hidratados com 300 mL de água destilada (proporção de 1:3). Os microcosmos foram mantidos à temperatura ambiente durante 189 dias.O experimento consistiu em dois tratamentos: com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro (12/12 h) e com 24 h de escuridão(Dark). Cada ambiente aquático subterrâneo consistiu em uma réplica diferente, ou seja, o sedimento de cada ambiente foi dividido para os dois tratamentos experimentais. Portanto, o delineamento continha 10 unidades experimentais (2 tratamentos x 5 ambientes aquáticos). O experimento foi realizado no Laboratório de Ecologia Aquática do Departamento de Oceanografia e Limnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

A cada dois dias (48horas), a água de cada recipiente foi filtrada em rede de plâncton de 68 µm de abertura de malha e os organismos zooplanctônicos foram quantificados e identificados ao menor nível taxonômico possível em microscópio óptico. A água destilada era reposta sempre ao final da coleta. Esse intervalo de amostragem foi

adotado para assegurar que os organismos observados fossem provenientes do banco de formas dormentes, e não de reprodução ativa dentro dos recipientes (Nielsen et al., 2013).

A normalidade dos dados de eclosão de eclosãoe riqueza foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos foi avaliada pelo teste de Levene. Diante da ausência de normalidade, a comparação do número de eclosões e riqueza de táxonsentre os tratamentos de luz e escuridão foi realizada por meio do teste de Wilcoxon pareado, considerando cada um dos cinco locais como um par (réplica emparelhada entre tratamentos). Todas as análises foram conduzidas no ambiente R (R Core Team, 2025),utilizando os pacotes, 'stats'e 'car'Wickham et al., 2023, Fox & Weisberg, 2019, Oksanen et al., 2023 eWickham, 2016 com nível de significância de $P < 0,05$.

Resultados e Discussões

Ao longo dos 189 dias de experimento, foram registradas 1.198 eclosões de zooplâncton, pertencentes a 12 táxons, sendo 1.176 eclosões e 11 táxons no tratamento com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, e apenas 7 eclosões e 3 táxons no tratamento mantido sob 24 h de escuridão constante (Figura 1).O maior número de eclosões ($W = 25$; $p = 0,0625$), embora marginalmente significativo, e a maior riqueza de táxons ($W = 1,5$; $p = 0,0318$) foram registrados no tratamento com fotoperíodo. Embora o teste estatístico pareado não tenha atingido significância formal em razão do número reduzido de réplicas, o padrão biológico foi consistente em 100% dos ambientes de penumbra amostrados, repetiu-se de forma consistente nos cinco locais analisados e reforçou a robustez do efeito observado. Em todos os cinco ambientes analisados, a eclosão no tratamento com fotoperíodo superou a do tratamento em escuridão constante. A riqueza de táxons diferiu significativamente entre os tratamentos (Teste de soma de postos de Wilcoxon, $W = 1,5$; $p = 0,0318$), indicando que a presença de luz (12/12) promoveu uma riqueza de espécies superior em comparação ao tratamento de escuro contínuo (Dark).

A Figura 2 mostra que a eclosão do zooplâncton ocorreu de forma muito mais antecipada e constante no tratamento com fotoperíodo (12/12 h) do que no tratamento em escuridão constante (Dark). No tratamento com luz, as primeiras eclosões foram registradas já em 31/03/2025, cerca de 21 dias após o início do experimento (10/03/2025), ainda que em poucas eclosões. A partir de maio, a eclosão sob fotoperíodo(12/12 h) se intensificou, com um primeiro pico expressivo em 26/05/2025 (aproximadamente 175 eclosões), e picos ainda maiores entre julho e setembro, chegando a quase 200 eclosões em 25/07/2025. Já no tratamento em escuridão constante, praticamente não houve eclosão ao longo de todo o experimento; a curva permanece próxima a zero do início até o final do período monitorado, com uma única exceção pontual em 04/07/2025, quando se observou um pequeno pico isolado (cerca de 6 eclosões), o único momento em que o tratamento Dark registrou alguma eclosão perceptível no gráfico. Portanto, a eclosão foi nitidamente mais rápida e mais frequente sob o tratamento com luz, que além de ter eclosões antes com uma diferença de aproximadamente 95 dias, o fotoperíodo sustentou eclosões repetidas e crescentes ao

longo de quase todo o experimento, enquanto o tratamento afótico produziu apenas um evento isolado de eclosão em todo período de monitoramento.

Ao todo, eclodiram 12 táxons de zooplâncton, distribuídos entre rotíferos(7 táxons), tecamebas(4 táxons) e cladócero(1 táxon). No tratamento com fotoperíodo (12/12 h), foram registrados 11 táxons, praticamente a totalidade da riqueza observada no estudo. Já no tratamento em escuridão constante (Dark), apenas 3 táxons eclodiram: o rotífero Keratella americana(Carlin,1943), que ocorreu exclusivamente nesse tratamento (n = 1; 0,1%), e Lecanepyriformis (Daday, 1905) e Tripleuchlanisplicata (Levander, 1894), que também eclodiram sob fotoperíodo, mas em número reduzido no escuro (somando 5 e 1 espécimes no escuro, respectivamente). Assim, além de concentrar a maior parte dos indivíduos eclodidos, o tratamento com luz também reuniu a quase totalidade da riqueza taxonômica registrada no estudo, enquanto o tratamento afótico permitiu a emergência de apenas um subconjunto reduzido e específico de táxons.

O cladóceroCoronatellasp. (Dybowski & Grochowski,1894) constituiu o organismo mais abundante do estudo, acumulando 635 indivíduos (53,7% do total geral). As amebas testáceas apresentaram expressiva representatividade por meio de Centropyxisdiscoides(Penard, 1890) Deflandre, 1929 (n = 140; 11,8%), Euglypharotunda(Ehrenberg, 1845)(n = 139; 11,7%),Centropyxissp. (Stein, 1857) (n = 3; 0,3%) e Difflugiapristis (Penard, 1902)(n = 2; 0,2%). Entre os rotíferos, destacaram-se Lecane bifurca var. crypta (Hauer, 1938)(n = 92; 7,8%), Lecanepyriformis (n = 91; 7,7%), LecaneEhrenberg, 1831sp.1 (n = 49; 4,1%),Cephalodellasp.(Bory de St. Vincent, 1826) (n = 23; 1,9%),Tripleuchlanisplicata (n = 7; 0,6%) eCephalodellasp.2 (Bory de St. Vincent, 1826) (n = 1; 0,1%).

A hipótese de que a eclosão do zooplâncton dormente seria maior sob fotoperíodo do que em escuridão constante foi corroborada, visto que em 100% dos ambientes subterrâneos de penumbra analisados, a eclosão no tratamento com luz superou a do tratamento afótico. Atribui-se esse padrão ao papel da luz como gatilho para a quebra da dormência, além de seu efeito indireto na disponibilidade de recursos alimentares por meio do desenvolvimento de biofilme microalgal (Gyllström & Hansson, 2004; Cáceres & Schwalbach, 2001).

A dominância dos rotíferos como o primeiro grupo a emergir e o mais rico taxonomicamente entre as formas dormentes, seguidos pelas tecamebas, se dá pelo fato de que os rotíferos produzem grandes quantidades de ovos de resistência capazes de suportar estresse ambiental extremo e eclodir rapidamente após a reidratação, em razão de seu pequeno porte corporal, curto tempo de geração e altas taxas reprodutivas (Ricci, 2001; Stelzer, 2005; Gilbert & Schröder, 2004), características que podem explicar sua dominância também nos ambientes de penumbra aqui analisados.

Foi observada uma variação no número de eclosões totais entre os locais e tratamentos (Figura 4). CRO apresentou a maior eclosão acumulada (aproximadamente 680 organismos), seguido por ODC (aproximadamente 350 organismos); os locais ODF, PFE e ZEJ apresentaram contribuições mais modestas, todas abaixo de 100 organismos acumulados.

Em relação à composição taxonômica por local, Coronatella sp. dominou amplamente em CRO, quase exclusivamente no tratamento com fotoperíodo. Em ODC, destacaram-

se Euglypha rotunda e Lecane sp1; em PFE, Lecane bifurca var. crypta (Bryce, 1892); e em ODF, Lecanepyriformis (Daday, 1905) e Lecane bifurca var. crypta (Bryce, 1892). Em ZEJ, observou-se um padrão distinto dos demais locais Cephalodella sp. teve uma maior taxa de eclosão no tratamento com fotoperíodo, enquanto Lecanepyriformis(Daday, 1905) apresentou maior número de eclosões no tratamento em escuridão, sendo o único caso entre os locais amostrados em que um táxon foi mais abundante no tratamento afótico do que no tratamento com luz. Esse achado em ZEJ chama atenção pois diverge da tendência geral, podendo refletir diferenças interespecíficas nos gatilhos de eclosão entre táxons (Gyllström & Hansson, 2004).

É importante destacar que os cinco ambientes aqui analisados correspondem exclusivamente à área de penumbra. Essa particularidade pode ter contribuído para a magnitude do efeito observado, já que bancos de ovos formados sob luminosidade parcial podem conter uma proporção maior de táxons que respondem a luz como gatilho do que aqueles depositados em cavidades permanentemente escuras, constituindo uma limitação a ser considerada na generalização destes resultados para outros tipos de ambientes subterrâneos (Radzikowski, 2013; Vargas et al., 2019; Puppin-Gonçalves et al., 2026).

Conclusão

Os resultados deste plano de trabalho corroboram que a luz atua como gatilho ambiental relevante para a eclosão de ovos de resistência do zooplâncton em ambientes aquáticos subterrâneos do semiárido potiguar.A luz configura-se, portanto, como um gatilho importante para a quebra da dormência do zooplâncton em ambientes aquáticos subterrâneos, atuando tanto sobre a magnitude quanto sobre a velocidade da eclosão das formas dormentes presentes no sedimento.Ainda assim, mais do que um simples gatilho pontual de eclosão, a luz deve ser compreendida dentro de um contexto mais amplo, em ambientes subterrâneos onde a luminosidade é naturalmente escassa ou ausente na maior parte do tempo, as formas dormentes presentes no sedimento funcionam sobretudo como uma memória biológica da comunidade, preservando uma diversidade de táxons. Nesse sentido, mais do que colonizadoras imediatas, essas formas dormentes atuam como um reservatório de espécies de longo prazo, sustentando o potencial de recolonização e a resiliência da fauna subterrânea diante de eventos de perturbação natural ou antrópica. Esses achados retomam a questão inicial sobre a relevância biológica de cavernas ainda pouco estudadas do Rio Grande do Norte e contribuem para o entendimento da dinâmica de bancos de ovos em ambientes cavernícolas vulneráveis a impactos antrópicos ,fornecendosubsídios para estratégias futuras de conservação e monitoramento desses ecossistemas.

Referências

BENTO, D. M.; CRUZ, J. B.; FREITAS, J. I. M.; CAMPOS, U. P.; OLIVEIRA, A. F. A mais de 1000! O patrimônio espeleológico potiguar após a descoberta da milésima

caverna. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 34., 2017, Ouro Preto. Anais... Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Espeleologia, 2017. p. 227-237.

BENTO, D. M.; SOUZA-SILVA, M.; VASCONCELLOS, A.; BELLINI, B. C.; PROUS, X.; FERREIRA, R. L. Subterranean “oasis” in theBraziliansemiaridregion: neglectedsourcesofbiodiversity. BiodiversityandConservation, v. 30, n. 1, p. 1-21, 2021.

BENTO, D. M.; FERREIRA, R. L.; VASCONCELOS, S.; LIMA, J. L. R. D.; OLIVEIRA, G.; SILVA, T. C.; LIMA, S. M. Q. Before it's too late: priorityareas for conservationofcrypticandthreatenedspeciesoftroglobiticarthropods in theBraziliansemiarid. BiodiversityandConservation, v. 33, p. 1985-2010, 2024.

BRENDONCK, L.; DE MEESTER, L. Egg banks in freshwaterzooplankton: evolutionaryandecologicalarchives in thesediment. Hydrobiologia, v. 491, p. 65-84, 2003.

BRENDONCK, L.; PINCEEL, T.; ORTELLS, R. Dormancyanddispersal as mediatorsofzooplanktonpopulationandcommunity dynamics along a hydrologicaldisturbancegradient in inlandtemporary pools. Hydrobiologia, v. 796, p. 201-222, 2017.

CÁCERES, C. E.; SCHWALBACH, M. S. Howwell do laboratoryexperimentsexplainfieldpatternsofzooplanktonemergence? FreshwaterBiology, v. 46, p. 1179-1189, 2001.

CECAV/ICMBio. Anuário estatístico do patrimônio espeleológico brasileiro. Brasília, DF: ICMBio, 2022.

FERREIRA, R. L.; PROUS, X.; MARTINS, R. P. Structureofbat guano communities in a dryBrazilian cave. Tropical Zoology, v. 20, p. 55-74, 2007.

FERREIRA, R. L.; PROUS, X.; BERNARDI, L. F. O.; SOUZA-SILVA, M. Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização e impactos. Revista Brasileira de Espeleologia, v. 1, p. 25-51, 2010.

FIŠER, C.; PIPAN, T.; CULVER, D. C. The vertical extentofgroundwatermetazoans: anecologicalandevolutionary perspective. BioScience, v. 64, n. 11, p. 971-979, 2014.

FONTANETO, D. Long-distance passive dispersal in microscopicaquaticanimals. Movement Ecology, v. 7, p. 1-10, 2019.

FOX, J.; WEISBERG, S. An R Companion to Applied Regression. 3. ed. Thousand Oaks: Sage, 2019.

GIBERT, J.; DANIELPOL, D. L.; STANFORD, J. A. GroundwaterEcology. San Diego: Academic Press, 1994.

GILBERT, J. J.; SCHRÖDER, T. Rotifersfromdiapausing, fertilizedeggs: unique features andemergence. LimnologyandOceanography, v. 49, p. 1341-1354, 2004.

GYLLSTRÖM, M.; HANSSON, L. A. Dormancy in freshwaterzooplankton: induction, terminationandtheimportanceofbenthic-pelagiccoupling. AquaticSciences, v. 66, p. 274-295, 2004.

LITCHMAN, E.; OHMAN, M. D.; KIØRBOE, T. Trait-based approaches tozooplanktoncommunities. JournalofPlanktonResearch, v. 35, n. 3, p. 473-484, 2013.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas. Anuário estatístico do patrimônio espeleológico brasileiro 2023-2024. Brasília, DF: ICMBio, 2025.

NIELSEN, D. L.; PODNAR, K.; WATTS, R. J.; WILSON, A. L. Empiricalevidencelinkingincreasedhydrologicstabilitywithdecreasedbioticdiversitywithinwetlands. Hydrobiologia, v. 708, p. 81-96, 2013.

OKSANEN, J. et al. vegan: Community EcologyPackage. R packageversion 2.6-4, 2023. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/package=vegan. Acesso em: 27 ago. 2026.

PUPPIN-GONÇALVES, C. T.; SANTOS-SILVA, A. K.; SILVA, A. M.; MOTA, C. E. A.; PETSCH, D. K.; BENTO, D. M.; BONECKER, C. C.; ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; DIAS, J. D. Hatching triggers anddiversitypatternsofzooplanktondormantstages in groundwaterecosystemsofthe Caatinga drylands. Hydrobiologia, 2026. DOI: https://doi.org/10.1007/s10750-025-06098-4.

R CORE TEAM. R: A languageandenvironment for statisticalcomputing. Vienna: R Foundation for StatisticalComputing, 2026. Disponível em: https://www.R-project.org. Acesso em: 27 ago. 2026.

RICCI, C. Dormancypatterns in rotifers. Hydrobiologia, v. 446, p. 1-11, 2001.

SIMÕES, L.; FERREIRA, T.; BICHUETTE, M. Aquatic biota ofdifferentkarst habitats in epigeanandsubterranean systems of Central Brazil. SubterraneanBiology, v. 11, p. 41-59, 2013.

SOUZA-SILVA, M.; LIRIA, C. C. S.; SAMPAIO, F. A. C.; FERREIRA, R. L. Transitoryaquatictaxocenosis in two neotropical limestone caves. Revista Brasileira de Espeleologia, v. 1, p. 29-41, 2012.

STELZER, C. P. Evolution ofrotiferlife histories. Hydrobiologia, v. 546, p. 335-346, 2005.

TRAJANO, E. Cave faunas in theatlantic tropical rainforest: composition, ecology, andconservation. Biotropica, v. 32, n. 4b, p. 882-893, 2000.

WICKHAM, H. ggplot2: ElegantGraphics for Data Analysis. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2016.

WICKHAM, H.; ÇETINKAYA-RUNDEL, M.; GROLEMUND, G. R for Data Science: Import, Tidy, Transform, Visualize, and Model Data. 2. ed. Sebastopol: O'Reilly Media, 2023.

Anexos



Figura1 1: Número total de eclosões por tratamento .



Figura 2: Tendência de eclosão ao longo do tempo.



Figura 3: Riqueza de táxons por local e tratamento.



Figura 4: Total de eclosões por local e tratamento.



Tabela: Quantidade de eclosões por táxon

CÓDIGO: SB1583

AUTOR: LUCAS VINÍCIUS DOS SANTOS COSTA

ORIENTADOR: VIVIANE SOUZA DO AMARAL

TÍTULO: Avaliação da susceptibilidade genética às doenças respiratórias na população de Lajes Pintadas

Resumo

A exposição crônica ao radônio-222 em Lajes Pintadas-RN representa risco à saúde pública, pois suas partículas alfa causam danos ao DNA e estresse oxidativo no epitélio respiratório, favorecendo o câncer de pulmão. Este estudo investigou a frequência dos polimorfismos de deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 na população local e sua utilidade como biomarcadores de suscetibilidade a doenças respiratórias associadas à radiação. A metodologia incluiu revisão bibliométrica (75 artigos, MEDLINE/Scopus, 1993-2023) e biomonitoramento por espirometria (VEF1) em indivíduos expostos cronicamente. Os resultados demonstram que o genótipo nulo de GSTM1 e/ou GSTT1 reduz a capacidade antioxidante celular, aumentando a vulnerabilidade a danos genotóxicos e o risco de câncer pulmonar, especialmente em populações expostas a xenobióticos. Conclui-se que a caracterização genética desses genes é relevante para identificar subgrupos vulneráveis e subsidiar estratégias de prevenção, rastreamento e terapia personalizada, sendo que a análise integrada dos dados genotípicos, espirométricos e de exposição permitirá estimar o risco populacional e fortalecer ações de saúde respiratória no município.

Palavras-chave: Biomonitoramento, Polimorfismo, Saúde Pública, Radônio, Semiárido

TITLE: Assessment of Genetic Susceptibility to Respiratory Diseases in the Population of Lajes Pintadas

Abstract

Abstract

Chronic exposure to radon-222 in Lajes Pintadas-RN represents a public health risk, as its alpha particles cause DNA damage and oxidative stress in the respiratory epithelium, favoring lung cancer. This study investigated the frequency of GSTM1 and GSTT1 gene deletion polymorphisms in the local population and their utility as biomarkers of susceptibility to radiation-associated respiratory diseases. The methodology included a bibliometric review (75 articles, MEDLINE/Scopus, 1993-2023) and biomonitoring through spirometry (FEV1) in chronically exposed individuals. The results demonstrate that the null genotype of GSTM1 and/or GSTT1 reduces cellular antioxidant capacity, increasing vulnerability to genotoxic damage and lung cancer risk, especially in populations exposed to xenobiotics. It is concluded that genetic characterization of these genes is relevant for identifying vulnerable subgroups and supporting prevention, screening, and personalized therapy strategies, and that integrated analysis of genotypic, spirometric, and exposure data will enable estimation of population risk and strengthen respiratory health actions in the municipality.

Keywords: Biomonitoring, Polymorphism, Public Health, Radon, Semiarid

Introdução

A exposição crônica à radiação ionizante de origem natural representa uma preocupação relevante de saúde pública. Entre eles, destaca-se o radônio-222, gás radioativo produzido na cadeia de decaimento do urânio, capaz de infiltrar-se e acumular-se em locais fechados. No município de Lajes Pintadas-RN, a presença de radioatividade natural elevada torna necessária a investigação dos possíveis efeitos dessa exposição sobre a saúde da população. Após a inalação, os produtos de decaimento do radônio emitem partículas alfa, que se depositam no epitélio respiratório e podem induzir quebras no DNA, estresse oxidativo, inflamação crônica e instabilidade genômica, favorecendo a carcinogênese pulmonar.

Entretanto, a magnitude dos efeitos biológicos da radiação não depende apenas da intensidade ou do tempo de exposição ambiental, mas também da suscetibilidade genética individual. Nesse contexto, os genes GSTM1 e GSTT1, pertencentes à família das glutationa S-transferases, apresentam relevância por codificarem enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e metabólitos reativos, bem como na defesa celular contra espécies reativas de oxigênio. A deleção homozigótica desses genes, denominada genótipo nulo, resulta na ausência da atividade enzimática correspondente e pode reduzir a capacidade antioxidante e protetora das células frente a agentes genotóxicos, incluindo aqueles relacionados à exposição ao radônio.

Assim, a avaliação dos polimorfismos de deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 na população de Lajes Pintadas-RN pode contribuir para o biomonitoramento da susceptibilidade genética às doenças respiratórias na população de Lajes Pintadas. Este estudo tem como objetivo determinar a frequência desses polimorfismos na população local e investigar sua utilidade como possíveis biomarcadores de vulnerabilidade ao desenvolvimento de alterações respiratórias e processos carcinogênicos associados à exposição à radiação alfa.

Metodologia

O estudo foi conduzido em duas etapas, sendo a primeira bibliométrica e a segunda de biomonitoramento, através de provas de função pulmonar. Para efeito da primeira etapa foi utilizado o protocolo PRISMA, com buscas nas bases MEDLINE e Scopus abrangendo publicações de 1993 a 2023. Ao final, foram selecionados e analisados 75 artigos científicos para avaliar a associação entre mutações de perda de função nos genes GSTT1 e GSTM1 e o desenvolvimento de câncer de pulmão. Para a segunda etapa estão sendo utilizados dados de VEF1 provenientes de espirometrias para estimar a função pulmonar dos pacientes expostos cronicamente à radiação.

Resultados e Discussões

A deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 constitui um importante fator de suscetibilidade ao câncer de pulmão, na medida em que reduz a capacidade antioxidante das células frente a agentes carcinogênicos inalatórios. As glutationas S-transferases (GSTs) exercem papel protetor ao catalisar a conjugação da glutationa a espécies reativas de oxigênio e a xenobióticos, promovendo a detoxificação celular e a redução do estresse oxidativo (HIGGINS; HAYES, 2011). Indivíduos com genótipos nulos para GSTM1 e/ou GSTT1 apresentam menor eficiência nesse sistema de defesa, o que os torna mais vulneráveis aos danos genotóxicos desencadeados por compostos presentes no tabaco, hidrocarbonetos aromáticos e outros poluentes ambientais (ADIBHESAMI et al., 2018; MININA et al., 2017; SCHUCH et al., 2023; SENGUPTA et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

Estudos demonstram associação consistente entre o polimorfismo nulo de GSTM1 e GSTT1 e o aumento do risco de câncer pulmonar, especialmente em populações expostas cronicamente a xenobióticos (AFIFAH et al., 2020; FUERTES; VAN DER PLAAT; MINELLI, 2020; SAMARELLI et al., 2021). Embora a deleção desses genes não seja considerada fator determinante isolado na carcinogênese, ela contribui para o processo neoplásico ao ampliar o estresse oxidativo e o dano ao DNA em células do epitélio respiratório. Além disso, há evidências de que o genótipo nulo possa influenciar a sobrevida após o tratamento, possivelmente por interferir na metabolização de quimioterápicos e na resposta ao estresse oxidativo induzido pela terapia (AFIFAH et al., 2020).

A relevância desse polimorfismo como marcador de suscetibilidade tem motivado investigações em diferentes grupos étnicos, incluindo populações do sudeste asiático, africanas e latino-americanas, com o objetivo de estratificar o risco de câncer de pulmão independentemente do nível de exposição ambiental (NAKANISHI et al., 2022; PIACENTINI et al., 2011). No entanto, ainda são necessários estudos que avaliem especificamente a relação entre a deleção de GSTM1/GSTT1 e o câncer pulmonar em não fumantes expostos a outros xenobióticos, a fim de esclarecer o peso relativo desse

polimorfismo em diferentes contextos de exposição e de integrar essas informações a estratégias de prevenção e tratamento personalizado.

No contexto específico da exposição ao radônio-222, os produtos de decaimento deste gás emitem partículas alfa de alta energia que, ao se depositarem no epitélio brônquico, induzem quebras de fita dupla no DNA, formação de espécies reativas de oxigênio e alterações epigenéticas que podem persistir por longos períodos. Indivíduos com genótipos nulos de GSTM1 e GSTT1, ao apresentarem capacidade reduzida de neutralizar esses radicais livres, podem acumular danos genômicos de forma mais acelerada, o que explicaria a maior incidência de alterações respiratórias observada em populações geneticamente susceptíveis residentes em áreas com elevada concentração geogênica de radônio. (AFIFAH et al., 2020)

Adicionalmente, a variabilidade na frequência dos polimorfismos de GSTM1 e GSTT1 deve ser considerada na interpretação dos resultados. Populações asiáticas, por exemplo, apresentam frequências mais elevadas do genótipo nulo de GSTM1 em comparação com populações europeias e africanas, o que pode influenciar diretamente a estratificação de risco em diferentes regiões geográficas. No Brasil, estudos em populações do sudeste e sul do país têm demonstrado frequências variáveis desses polimorfismos, reforçando a necessidade de caracterização genética específica em cada região, especialmente em municípios como Lajes Pintadas-RN, onde fatores ambientais e genéticos podem atuar de forma sinérgica na determinação do risco de doenças respiratórias. SENGUPTA et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

Outro aspecto relevante diz respeito à possível interação entre os polimorfismos de GSTM1/GSTT1 e outros fatores de risco modificáveis, como tabagismo, exposição ocupacional a poeiras e fumos, e condições socioeconômicas que podem influenciar o acesso a medidas de proteção e diagnóstico precoce. A combinação de genótipos nulos com histórico de tabagismo, por exemplo, tem sido associada a um risco multiplicado de câncer de pulmão em comparação com cada fator isoladamente, evidenciando o caráter multifatorial da carcinogênese pulmonar. Da mesma forma, a exposição concomitante a outros xenobióticos, como metais pesados e pesticidas, pode potencializar os efeitos genotóxicos em indivíduos geneticamente susceptíveis, destacando a importância de uma abordagem integrada que considere tanto fatores genéticos quanto ambientais na avaliação do risco populacional.(ZHANG et al., 2021).

Por fim, é fundamental reconhecer que, embora os genes GSTM1 e GSTT1 corroborem de forma significativa para a proteção celular contra o estresse oxidativo e o dano genotóxico, eles não atuam isoladamente nesse processo. A literatura científica evidencia que outros genes desempenham papéis complementares e igualmente relevantes no combate ao dano oxidativo e na manutenção da integridade genômica. Entre esses genes, destacam-se o CYP1A12A e o CYP2E12B, envolvidos no metabolismo de carcinógenos inalatórios e na biotransformação de compostos xenobióticos, e o XRCC3, que participa ativamente dos mecanismos de reparo do DNA, especialmente no reparo de quebras de fita dupla induzidas por radiação ionizante. (RODRIGUES DE SOUZA; SAVIO DE ARAUJO-SOUZA; MORAIS LEME, 2022).

Portanto, a atuação coordenada desses diferentes sistemas enzimáticos e de reparo sugere que a suscetibilidade ao câncer de pulmão resulta de uma rede complexa de interações genéticas, na qual a deficiência em um ou mais componentes pode

comprometer a capacidade global de defesa celular. Dessa forma, futuras investigações devem considerar a avaliação integrada de múltiplos polimorfismos genéticos para obter uma compreensão mais abrangente da suscetibilidade individual e desenvolver estratégias de prevenção e intervenção mais eficazes em populações expostas a agentes oxidantes ambientais.

Conclusão

O presente estudo reforça que a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 representa um importante marcador de suscetibilidade genética ao câncer de pulmão e a outras doenças respiratórias, na medida em que compromete a capacidade antioxidante das células frente a xenobióticos inalatórios. A redução da atividade das glutationas S-transferases em indivíduos com genótipos nulos amplia o estresse oxidativo e o dano genotóxico no epitélio respiratório, contribuindo para o processo carcinogênico, especialmente em contextos de exposição crônica a agentes oxidantes.

Os achados reforçam a relevância da caracterização genética de GSTM1 e GSTT1 como ferramenta para identificar subgrupos com maior vulnerabilidade a doenças respiratórias e oncológicas. Essa informação pode subsidiar estratégias de prevenção, rastreamento precoce e personalização terapêutica, particularmente em populações expostas a agentes oxidantes ambientais ou ocupacionais.

No contexto do projeto “Avaliação da susceptibilidade genética às doenças respiratórias na população de Lajes Pintadas”, a etapa de biomonitoramento ainda será concluída. O biomonitoramento consistirá na avaliação da função pulmonar por meio da espirometria, com ênfase na mensuração do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), em indivíduos submetidos a níveis elevados de radiação por períodos prolongados. A análise integrada dos dados genotípicos, espirométricos e de exposição permitirá estimar o risco populacional, identificar grupos prioritários para intervenções em saúde e fortalecer ações de vigilância e promoção da saúde respiratória no município.

Referências

ADIBHESAMI, G. et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) Polymorphisms and Lung Cancer Risk among a Select Group of Iranian People. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 19, n. 10, out. 2018.

AFIFAH, N. N. et al. Genetic Polymorphisms and the Efficacy of Platinum-Based Chemotherapy: Review. Pharmacogenomics and Personalized Medicine, v. Volume 13, p. 427–444, out. 2020.

ALARCÓN-CAPEL, E.; RUANO-RAVINA, A.; BARROS-DIOS, J. M. [Radon exposure and genitourinary cancer in miners]. Gaceta Sanitaria, v. 35, n. 1, p. 72–80, 2021.

ARONSON, J. K.; FERNER, R. E. Biomarkers-A General Review. Current Protocols in Pharmacology, v. 76, p. 9.23.1-9.23.17, 17 mar. 2017.

BELETE, G. D.; SHIFERAW, A. M. A Review of Studies on the Seasonal Variation of Indoor Radon-222 Concentration. Oncology Reviews, v. 16, p. 10570, 2022.

BERSIMBAEV, R. et al. Radon Biomonitoring and microRNA in Lung Cancer. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 6, p. 2154, 20 mar. 2020.

BOSSEW, P. et al. Development of a Geogenic Radon Hazard Index-Concept, History, Experiences. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 17, n. 11, p. 4134, 10 jun. 2020.

BUKOWSKI, K.; WOŹNIAK, K. Polymorphism of genes encoding proteins of DNA repairvs. occupational and environmental exposure to lead, arsenic and pesticides. Medycyna Pracy, 12 out. 2017.

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), v. 243, n. 3, p. 213–221, fev. 2018.

CARDOSO TAKAHASHI, L. et al. Radon dosimetry using Solid State Nuclear Track Detectors in different environments: a review. Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine, v. 186, p. 110217, ago. 2022.

CÓDIGO: SB1585

AUTOR: VIVIANE COSTA MONTEIRO DA SILVA

ORIENTADOR: BRUNO TOMIO GOTO

TÍTULO: Diversidade e composição das espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares (GLOMEROMYCOTA) emFlorestas de Araucária no bioma Mata Atlântica

Resumo

Mata Atlântica é um hotspot global de biodiversidade reduzido a cerca de 12,4% de vegetação nativa preservada. Nela, destaca-se a Floresta Ombrófila Mista (FOM), caracterizada pela dominância de Araucaria angustifolia. Devido a características físicas e nutricionais do solo, os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) exercem um papel fundamental na ciclagem nutricional e regeneração vegetal por meio de simbiose biotrófica obrigatória. O presente estudo avaliou a composição da comunidade de FMAs presentes no solo da região da Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais. Foram coletadas amostras de solo em duas tipologias: Floresta Plantada Adulta (FPA) (Área 1) e Floresta Secundária Adulta (FSA) (Área 2), e processadas no LBM/UFRN. A comunidade fúngica foi composta por 10 táxons de FMAs identificados a nível de espécie. A FSA apresentou menor acidez (pH = 4,35; m = 16,67%) e maior fertilidade (SB = 37,37 mmolc/dm³), favorecendo o domínio de Glomeraceae, como Glomus sp. cf. trufemii (46,15% de abundância relativa na FSA e 44,34% no total), Dominikia sp. e Septoglomus sp. cf. furcatum. Os teores de P mantiveram-se baixos e homogêneos, justificando a importância da presença funcional dos FMA. Conclui-se que os atributos químicos do solo atuam como filtro ecológico, moldando a estrutura de Glomeromycota na Serra da Mantiqueira.

Palavras-chave: Araucaria angustifolia; Glomerosporos ; ecologia solo ; diversidade

TITLE: Diversity and species composition of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota) in Araucaria Forests within the Atlantic Forest biome

Abstract

The Atlantic Forest is a global biodiversity hotspot reduced to approximately 12.4% of preserved native vegetation. Within it, the Mixed Ombrophilous Forest (MOF) stands out, characterized by the dominance of Araucaria angustifolia. Due to the physical and nutritional characteristics of the soil, Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) play a fundamental role in nutrient cycling and plant regeneration through obligate biotrophic symbiosis. The present study evaluated the composition of the AMF community present in the soil of the Serra da Mantiqueira region, Minas Gerais state, Brazil. Soil samples were collected from two forest typologies: Adult Planted Forest (APF) (Area 1) and Adult Secondary Forest (ASF) (Area 2), and processed at LBM/UFRN. The fungal community comprised 10 AMF taxa identified to the species level. The ASF exhibited lower acidity (pH = 4.35; m = 16.67%) and higher fertility (BS = 37.37 mmolc/dm³), favoring the dominance of Glomeraceae, such as Glomus sp. cf. trufemii (46.15% relative abundance in ASF and 44.34% overall), Dominikia sp., and Septoglomus sp. cf. furcatum. Phosphorus (P) levels remained low and homogeneous, underscoring the functional importance of AMF presence. It is concluded that soil chemical attributes act as an ecological filter, shaping the structure of Glomeromycota in the Serra da Mantiqueira.

Keywords: Araucaria angustifolia; Glomerospores ; Soil ecology; fungal Diversity

Introdução

A Mata Atlântica é reconhecida globalmente por ser um dos principais hotspots de biodiversidade, abrigando uma variedade de organismos em sua fauna e flora (MYERS et al., 2000). Originalmente ocupava cerca de 1,3 milhão de km², estendendo-se ao longo da faixa litorânea Atlântica e do interior de 17 estados do território brasileiro (IBGE, 2019). Porém, o histórico intenso de ocupação humana associado à expansão urbana e à conversão do uso do solo para atividades agropecuária e silvicultura promoveu a massiva redução da cobertura vegetal original. Estima-se que apenas 12,4% da vegetação nativa permaneça em condições conservadas, compondo um conjunto florestal fragmentado e suscetível a contínuos impactos antrópicos (RIBEIRO et al., 2009; SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2023).

Com uma elevada heterogeneidade ambiental, a Mata Atlântica possui fitofisionomias que se estendem desde as Florestas Ombrófilas Densas à Restinga, refletindo a influência do gradiente de latitude e altitude (MYERS et al., 2000). Entre as fitofisionomias que compõem a Mata Atlântica, destaca-se a Floresta Ombrófila Mista (FOM), também conhecida como Mata de Araucária. Distribuída predominantemente em regiões climáticas subtropicais e de altitude, essa formação caracteriza-se pela ocorrência predominante da espécie Araucaria angustifolia (Bertol.) O. Kuntze, uma gimnosperma nativa de grande relevância ecológica, econômica e cultural (CARLUCCI et al., 2011). Com a diminuição da área de ocorrência original, os remanescentes em estágio avançado de regeneração representam uma parcela reduzida da FOM, conferindo a esses fragmentos elevada importância para a conservação da biodiversidade e para o desenvolvimento de estudos ecológicos (RIBEIRO et al., 2009).

Os solos característicos da Mata Atlântica, como Latossolos e Argissolos, são predominantemente profundos, marcados por forte intemperização devido ao clima úmido, com reação ácida e com baixa fertilidade natural, apresentando pouca

quantidade de fósforo lábil (P) (EMBRAPA, 2018). Com essa limitação nutricional, os microrganismos do solo exercem papel crucial na manutenção da vegetação, com destaque para a microbiota simbionte associada ao sistema radicular das plantas (BARETTA et al., 2008).

Dentre estes microrganismos, destacam-se os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota. Estes fungos estabelecem uma simbiose obrigatória com a maioria das angiospermas e gimnospermas terrestres, incluindo a A. angustifolia e as demais espécies arbóreas nativas da FOM (BARBOSA, 2024). Por meio do desenvolvimento de uma extensa rede de hifas, os FMAs aumentam a área de absorção das raízes, otimizando a captação de água e de elementos nutricionais na solução do solo, principalmente o fósforo, enquanto recebem em contrapartida fotoassimilados carbonados sintetizados pela planta hospedeira (VILCATOMA-MEDINA et al., 2021). Essa associação mutualística é extremamente importante para o estabelecimento e sobrevivência das plantas, aumentando a resistência da comunidade vegetal frente a estresses ambientais (FOLLI-PEREIRA et al., 2012).

Apesar da importância funcional, o conhecimento sobre a diversidade, riqueza e composição taxonômica da comunidade de Glomeromycota na Floresta de Araucária ainda apresenta lacunas expressivas (BARBOSA, 2024). A intensa fragmentação florestal e a alteração das propriedades químicas e físicas do solo vindas do uso antrópico podem alterar a densidade de esporos e a estrutura dessas comunidades fúngicas (OEHL et al., 2010). Essa perda de biodiversidade funcional subterrânea pode comprometer diretamente os serviços ecossistêmicos de ciclagem de nutrientes e a capacidade de regeneração natural da A. angustifolia e de espécies associadas.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e a composição de espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares (Glomeromycota) em áreas de Floresta de Araucária no bioma Mata Atlântica, correlacionando a estrutura dessas

Metodologia

Área de Estudo

A coleta foi realizada em florestas de Araucária localizadas na Serra da Mantiqueira, no município de Bueno Brandão, Minas Gerais, nas coordenadas médias de 22°26′27″ S, 46°21′6″ W. A região encontra-se em um relevo de montanhas, com altitudes superiores a 1.200 m. O clima regional, de acordo com a classificação de Köppen, é caracterizado como Tropical de Altitude (Cwb), com invernos frios e secos e verões amenos e pluviosos, apresentando temperatura média anual em torno de 17 °C e precipitação média anual de 1.300 a 1.600 mm (ESPERANÇA JUNIOR, 2015). Os solos da área são predominantemente Cambissolos e Latossolos distróficos, com acúmulo de matéria orgânica na camada superficial e baixa disponibilidade de fósforo lábil (BENITES et al., 2007).

As áreas amostradas foram classificadas de acordo com o histórico de uso da terra e a fitossociologia vegetal em duas tipologias: Floresta Plantada Adulta (FPA), caracterizada por um plantio antrópico de Araucaria angustifolia; e Floresta Secundária

Adulta (FSA), constituída por um remanescente florestal sob processo de regeneração natural de estágio avançado (MOREIRA-SOUZA et al., 2003; BARETTA et al., 2008). Essa classificação permite avaliar a resposta da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota) frente ao gradiente de intervenção antrópica e complexidade florística.

Coleta e processamento de amostras

Em cada uma das 2 áreas, foram coletadasamostras de solo em 4 pontos diferentes.O delineamento amostral resultou em 8 amostras, que foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis em isopor, e enviadas para o Laboratório de Biologia de Micorrizas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LBM/UFRN). Para a extração de glomerosporos do solo foi realizada, a partir de 100g do solo coletado, os métodos de decantação e peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963, adaptado), seguidos por centrifugação em soluções de água e sacarose 70% (JENKINS 1964, adaptado). Os esporos isolados foram montados em lâminas em PVLG (álcool-polivinílico-lactoglicerol) e PVLG + Reagente de Melzer (1:1). Para a identificação taxonômica das espécies foram utilizadas descrições na literatura especializada foram utilizadas chaves dicotômicas (BLASZKOWSKI 2012; WIJAYARWARDENE et al. 2022; HYDE et al 2024).

A análise química das amostras de solo foi realizada a partir da fração de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA), obtida após secagem das amostras em estufa e peneiramento em malha de 2,0 mm, seguindo os protocolos analíticos padronizados para fertilidade do solo (TEIXEIRA et al., 2017). A acidez ativa (pH) foi determinada por meio da medição em água na proporção solo: solução de 1:2,5, utilizando um pHmetro de bancada calibrado. A matéria orgânica do solo (MatOrg) foi estimada a partir do carbono orgânico obtido por oxidação por via úmida com dicromato de potássio em meio ácido (método de Walkley-Black). O fósforo lábil (P) e o potássio trocável (K) foram extraídos pela solução de Mehlich-1 (HCl 0,05 mol/L + H2SO4 0,0125 mol/L), sendo a concentração de P determinada por espectrofotometria pelo método do complexo fosfomolíbdico e o K por fotometria de chama. Os teores trocáveis de cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e alumínio (Al^{3+}) foram extraídos com solução de cloreto de potássio (KCl 1,0 mol/L), sendo o Ca^{2+} e o Mg^{2+} quantificados por espectrometria de absorção atômica e o Al^{3+} determinado por titulação de neutralização com solução de NaOH 0,025 mol/L. A acidez potencial (H + Al) foi determinada por extração com solução tampão de acetato de cálcio a pH 7,0 seguida de titulação. A partir dos atributos determinados diretamente, foram calculados os parâmetros complexos e índices de saturação: a Soma de Bases (SB) foi obtida pelo somatório dos teores de Ca^{2+}, Mg^{2+} e K^{+}; a Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0 (CTC) foi calculada pela soma da SB com a acidez potencial (H + Al); a Saturação por Bases (V) foi expressa como a porcentagem da CTC ocupada por bases trocáveis [$V(\%) = (SB / CTC) \times 100$]; e a Saturação por Alumínio (m) foi calculada como a porcentagem de alumínio trocável em relação à CTC efetiva [$m(\%) = (Al^{3+} / (SB + Al^{3+})) \times 100$]. A análise da qualidade do solo foi realizada para mensurar a composição química do substrato, visto que fatores edáficos como pH, acidez trocável, teor de matéria orgânica e, principalmente, a disponibilidade de fósforo atuam como seletores ambientais diretos sobre a esporulação e a diversidade fúngica (SMITH & READ, 2008; OEHL et al., 2010).

Análises ecológicas

As espécies identificadas foram analisadas e comparadas utilizando à frequência de ocorrência (FO) e à abundância relativa (AR). A FO foi calculada a partir da fórmula: (número de amostras em que a espécie está presente/número total de amostras) × 100, enquanto a AR foi determinada por: (número de indivíduos da espécie/número total de indivíduos da comunidade) × 100. A riqueza de espécies correspondeu ao total de espécies registradas por amostra, e a diversidade foi estimada por meio do índice de Shannon, e a uniformidade na distribuição da abundância dos táxons foi avaliada pelo índice de equitabilidade de Pielou (J'), calculado pela razão J' = H' / ln(S).

Resultados e Discussões

A análise da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) resultou na recuperação de 106 esporos, distribuídos em 18 táxons identificados em nível de espécie ou gênero, pertencentes à classe Glomeromycetes e às ordens Glomerales e Archaeosporales (Tabela 1 e gráfico 1).

O Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') revelou valores similares entre os ambientes estudados, sendo de 1,48 na Floresta Plantada Adulta (FPA) e de 1,42 na Floresta Secundária Adulta (FSA) (Tabela 4). Embora a riqueza de espécies tenha sido ligeiramente superior na FSA (S = 11) em comparação à FPA (S = 10), a FPA apresentou maior equitabilidade de Pielou (J' = 0,64 vs. J' = 0,59). Essa variação na equitabilidade é explicada pela forte dominância exercida por Glomus sp. cf. trufemii na área em regeneração (FSA), onde a espécie respondeu por cerca de 46,15% da abundância relativa local, reduzindo a uniformidade na distribuição dos táxons em relação à área plantada.

A espécie Glomus sp. cf. trufemii apresentou ampla dominância na área de estudo (44,34% de Abundância Relativa total), registrando alta Frequência de Ocorrência (FO) em ambas as áreas (75,0% na FPA e 100,0% na FSA), com 42,59% de AR na Área 1 (FPA) e 46,15% de AR na Área 2 (FSA) (Tabela 3). Em contrapartida, a Área 1 (FPA) distinguiu-se pela ocorrência exclusiva de táxons como Acaulospora morrowiae e Acaulospora sp. cf. cavernata (ambas com AR = 9,26%), além de Glomus sp. (AR = 14,81%). Na Área 2 (FSA), destaca-se a ocorrência exclusiva de Funneliformis sp. 1 (AR = 26,92%) e de Septoglomus sp. cf. furcatum (AR = 9,62%) (Tabela 3).

A análise química dos solos revelou um contraste edáfico expressivo entre as áreas (Tabela 2). Ambas as tipologias florestais apresentaram reação fortemente ácida, com valores médios de pH em água de 4,05 ± 0,04 na Área 1 (FPA) e 4,35 ± 0,07 na Área 2 (FSA), padrão característico de solos sob Floresta Ombrófila Mista e formações da Serra da Mantiqueira (BENITES et al., 2007; BARETTA et al., 2008). Porém, a maior acidez na Área 1 esteve associada a elevadas concentrações de alumínio trocável (Al3+ = 23,54 ± 3,48 mmolc/dm³) e a uma elevada saturação por alumínio (m = 55,33 ± 5,68%). A Área 2 apresentou menor acidez e condições edáficas mais favoráveis, com teores de Al3+ substancialmente inferiores (6,63 ± 2,44 mmolc/dm³) e saturação por alumínio reduzida (m = 16,67 ± 7,77%). A presença de níveis elevados de Al3+ atua como um fator de estresse abiótico, inibindo o alongamento radicular em espécies vulneráveis (KOCHIAN et al., 2004). Sob tais limitações, os FMAs desempenham

função protetora, imobilizando íons de Al3+ na parede celular hifal e na matriz mucilaginosa rica em glomalina, diminuindo o estresse tóxico sobre o sistema radicular de Araucaria angustifolia (MOREIRA-SOUZA et al., 2007).

O teor de matéria orgânica (MO) foi significativamente superior na Área 1 (57,32 ± 5,86 g/kg) em comparação à Área 2 (33,73 ± 3,22 g/kg). O acúmulo de material orgânico na floresta plantada decorre do aporte contínuo de acículas de A. angustifolia, ricas em lignina e compostos fenólicos recalcitrantes cuja ciclagem é desacelerada pela acidez e pelas baixas temperaturas de altitude (BARETTA et al., 2008).

Por sua vez, a maior diversidade florística da Área 2 forma uma serrapilheira heterogênea e favorece maior atividade biológica, ocasionando uma aceleração na ciclagem de nutrientes e maior fertilidade natural: a Área 2 apresentou Soma de Bases (SB = 37,37 ± 7,52 mmolc/dm³) e Saturação por Bases (V = 29,83 ± 6,91%) superiores às da Área 1 (SB = 18,02 ± 1,88 mmolc/dm³; V = 9,67 ± 1,03%).

Os teores de fósforo disponíveis mantiveram-se baixos e homogêneos entre os ecossistemas (14,55 ± 2,42 mg/dm³ na Área 1 e 13,85 ± 1,00 mg/dm³ na Área 2). Essa limitação no P lábil constitui o principal gatilho fisiológico para o estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular (SMITH; READ, 2008). Nesses solos com forte retenção de fosfatos pelo complexo coloidal, a rede de hifas extrarradiculares amplia o volume de solo explorado, assegurando o suprimento nutricional e a sustentabilidade de A. angustifolia (MOREIRA-SOUZA et al., 2007).

O ambiente mais ácido e com maior estresse por alumínio na Área 1 favoreceu a presença de integrantes adaptados da família Acaulosporaceae (como Acaulospora lacunosa e Acaulospora mellea). Fungos do gênero Acaulospora são reconhecidamente adaptados a solos ácidos e distróficos, tolerando altas concentrações de Al3+ trocável (STÜRMER; SIQUEIRA, 2006; MOREIRA-SOUZA et al., 2007). Em contraste, o solo da Área 2, caracterizado por menor saturação por alumínio e maior disponibilidade de bases trocáveis, favoreceu o estabelecimento e a esporulação maciça de integrantes da família Glomeraceae, como Glomus sp. cf. trufemii, Dominikia sp. e Septoglomus sp. cf. furcatum.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que, embora a riqueza apresentada nas duas áreas de diferentes tipologias não tenha apresentado uma diferença significativa, o histórico de uso da terra e a tipologia vegetacional desempenham um papel determinante na estruturação das comunidades de Fungos Micorrízicos Arbusculares (Glomeromycota) na Floresta Ombrófila Mista da Serra da Mantiqueira. As propriedades químicas do solo atuam como um filtro ecológico primário, direcionando a seleção de diferentes estratégias fúngicas em função do grau de conservação e manejo das áreas.

A simbiose micorrízica mostra-se indispensável para a manutenção do ecossistema em ambas as condições estudadas, impulsionada pela restrição homogênea de fósforo

disponível no solo. Contudo, a variação da acidez, da saturação por alumínio e da disponibilidade de bases trocáveis conduz a transição na composição fúngica: enquanto ecossistemas com maior acidez e toxicidade por alumínio selecionam táxons adaptados a condições estressantes, cruciais para a resiliência e proteção do sistema radicular da Araucaria angustifolia, ambientes em regeneração com maior dinâmica nutricional favorecem a dominância de famílias generalistas.

Referências

BARBOSA, M. C. Estrutura da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares em florestas de Araucaria angustifolia. 2024. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024.

BARETTA, Dilmar et al. Análise multivariada da fauna edáfica e atributos microbiológicos em ecossistemas com Araucaria angustifolia. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 2301-2309, 2008.

BENITES, Vinícius de Melo et al. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 569-577, 2007.

BLASZKOWSKI, Janusz. Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences: Kraków, 2012. 303 p.

CARLUCCI, Marcos Bergmann et al. Conservação da Floresta com Araucária no Extremo Sul do Brasil. Natureza & Conservação, v. 9, n. 1, p. 111-114, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

ESPERANÇA JUNIOR, E. V. Mapeamento da ocorrência de Araucaria angustifolia no município de Bueno Brandão-MG através de imagens RapidEye. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Gestão Ambiental) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Inconfidentes, 2015.

FOLLI-PEREIRA, M. S.; MEIRA-HADDAD, L. S.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C. M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, n. 6, p. 1663-1679, 2012.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica: Período 2021-2022. São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE, 2023.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.

HYDE, Kevin D. et al. The 2024 Outline of Fungi and fungus-like taxa. Mycosphere, v. 15, n. 1, p. 5146-6239, 2024.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Biomas e Sistema Costeiro-Marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250.000. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. (Série Relatórios Metodológicos, v. 45).

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. The Plant Disease Reporter, v. 48, p. 692, 1964.

KOCHIAN, L. V., Hoekenga, O. A., & Pineros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. Annual review of plant biology, 55, 459–493.

MOREIRA-SOUZA, Milene et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. Mycorrhiza, v. 13, n. 4, p. 211-215, 2003.

MOREIRA-SOUZA, Milene et al. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in Araucaria angustifolia forest. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 393-399, 2007.

MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

OEHL, Fritz et al. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. Soil Biology and Biochemistry, v. 42, n. 5, p. 724-738, 2010.

OEHL, Fritz et al. Acaulospora reducta sp. nov. and A. excavata — two glomeromycota fungi with pitted spores from Brazil. Mycotaxon, v. 130, n. 4, p. 983-995, 2015.

RIBEIRO, Milton Cezar et al. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation, Amsterdam, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

SMITH, Sally E.; READ, David J. Mycorrhizal Symbiosis. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2008. 800 p.

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Fungos micorrízicos arbusculares em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 537-584.

TEIXEIRA, P. C. et al. Manual de métodos de análise de solo. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 573 p.

VILCATOMA-MEDINA, C., Dolinski, M. A., Mendoza-Cortez, J. W., Kaschuk, G., Constantino, V., Stürmer, S., & Zanette, F. (2021). Micorrhyzal colonisation on Araucaria seedling with different doses of nitrogen, phosphorus and potassium. Agriculture & Forestry/Poljoprivreda i šumarstv, 67(2), 163.

WIJAYAWARDENE, Nalin N. et al. Outline of fungi and fungus-like taxa – 2021. Mycosphere, v. 13, n. 1, p. 53-453, 2022.

CÓDIGO: SB1594

AUTOR: PEDRO VICTOR DE VASCONCELOS DUARTE

ORIENTADOR: ELIZA MARIA XAVIER FREIRE

TÍTULO: Da concepção ao nascimento: revisão bibliométrica sobre biologia reprodutiva de Amphisbaena Linnaeus, 1758 (Squamata:Amphisbaenidae), nos últimos 20 anos

Resumo

Os anfisbenídeos constituem um grupo de répteis ápodos, fossoriais, serpentiformes e amplamente distribuídos na América do Sul, principalmente no Brasil. Dentre os gêneros pertencentes a este táxon, Amphisbaena é o mais especioso. Trabalhos sobre história natural e biologia reprodutiva são pouco explorados, e informações relevantes sobre reprodução são inexistentes para muitas espécies. Cabe destacar para este estudo, o encontro e coleta de uma fêmea grávida de Amphisbaena vermicularis, a qual foi coletada, observada em terrário e acompanhada até sua oviposição e registro do tamanho de ninhada; esta oviposição revelou novidades reprodutivas para a espécie. A revisão bibliométrica sistematizada possibilitou levantar informações disponíveis na literatura acerca de aspectos reprodutivos do gênero Amphisbaena nos últimos 20 anos. Utilizaram-se palavras-chave em português, inglês e espanhol para buscar trabalhos nas principais bases de dados da literatura; a partir dos trabalhos encontrados, foi utilizado o método bola de neve. Foram encontrados 16 artigos científicos sobre aspectos reprodutivos de Amphisbaena, publicados entre 2006 e 2026. Dentre as 103 espécies conhecidas, apenas para 17 (16,50%) foram encontradas informações reprodutivas na literatura. Os temas mais abordados foram tamanho de ninhada, dimensão dos ovos, ciclo reprodutivo, estrutura reprodutiva e maturidade sexual. Conclui-se que o conhecimento acerca da biologia reprodutiva de Amphisbaena permanece limitado.

Palavras-chave: Amphisbaenia. Reprodução. Oviposição. Tamanho de Ninhada. Ovos.

TITLE: From conception to hatching: a bibliometric review of the reproductive biology of Amphisbaena Linnaeus, 1758 (Squamata: Amphisbaenidae) over the last 20 years

Abstract

Amphisbaenians comprise a group of limbless, fossorial, and serpentine reptiles widely distributed throughout South America, particularly in Brazil. Among the genera within

this taxon, Amphisbaena is the most species-rich. Studies on the natural history and reproductive biology of these reptiles remain scarce, and relevant reproductive information is unavailable for many species. Of particular relevance to this study was the collection of a gravid female of Amphisbaena vermicularis, which was maintained in a terrarium and monitored until oviposition, allowing the documentation of clutch size. This oviposition event provided novel reproductive information for the species. A systematic bibliometric review was conducted to compile the information available in the literature on reproductive aspects of the genus Amphisbaena over the last 20 years. Keywords in Portuguese, English, and Spanish were used to search the main literature databases, followed by a snowball sampling approach based on the studies retrieved. Sixteen scientific articles addressing reproductive aspects of Amphisbaena, published between 2006 and 2026, were identified. Among the 103 currently recognized species, reproductive information was found for only 17 (16.50%). The most frequently addressed topics were clutch size, egg dimensions, reproductive cycle, reproductive structures, and sexual maturity. We conclude that knowledge of the reproductive biology of Amphisbaena remains limited.

Keywords: Reproduction. Oviposition. Clutch Size. Eggs.

Introdução

Os anfisbenídeos (Squamata: Amphisbaenia) constituem um grupo monofilético de répteis ápodos, de hábito fossorial, corpo serpentiforme e amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, bastante diversos na América do Sul, principalmente no Brasil (Gans, 1978; Vanzolini, 2002). Este país abriga cerca de 40% da diversidade global, que compreende 85 das 204 espécies atualmente reconhecidas (Costa et al., 2026; Uetz et al., 2026). Dentre os gêneros pertencentes a este táxon, Amphisbaena Linnaeus, 1758 é o mais especioso, reunindo 103 espécies descritas e amplamente distribuídas no continente americano (Uetz et al., 2026).

A maioria dos estudos acerca de Amphisbaena se concentra na área de taxonomia e/ou filogenia (Gans, 1976; Vanzolini, 2002; Perez & Borges-Martin, 2019); trabalhos sobre história natural e biologia, particularmente sobre biologia reprodutiva são pouco explorados, fato que pode ser justificado devido ao hábito fossorial e consequente dificuldade de encontros com esses animais (Santos, 2013; Colli et al., 2016;). Informações relevantes como tamanho de ninhada, registros de oviposição, tempo de incubação, dimensão dos ovos e tamanho de eclosão são escassas para muitas espécies e, quando disponíveis, encontram-se em artigos pontuais e dados de coleções herpetológicas (Gans & Alexander, 1962; Andrade et al., 2006; Colli et al., 2016).

Andrade et al., (2006) levantaram dados sobre a biologia reprodutiva de Amphisbaenia e constataram para apenas 22 espécies, pertencentes a 11 gêneros. Outros estudos também analisaram o ciclo reprodutivo e possível sazonalidade, mas utilizando apenas macroscopia das gônadas (Gorzula et al., 1976; Colli e Zamboli, 1999; Vega 2001; Balestrin e Capellari, 2011). Santos, (2013) analisou anfisbenídeos do Brasil, para mensurar ciclo reprodutivo e anatomia reprodutiva comparada. Registros de oviposição de Amphisbaena na literatura são em baixa quantidade, quando comparado ao número de espécies descritas (Goeldi, 1898; Gans e Alexander, 1962; Jared et al., 1997; Barros-Filho e Nascimento, 2003; Andrade et al., 2006).

Cabe destacar que estudos acerca da biologia reprodutiva de répteis são fundamentais, pois fortalecem a compreensão de aspectos ecológicos, evolutivos e comportamentais, uma vez que o padrão reprodutivo está intimamente ligado aos hábitos de vida e adaptações ambientais (Shine, 2005). Nesse sentido, alguns estudos envolvendo aspectos reprodutivos de anfisbenídeos sugerem que o modo de vida subterrâneo pode influenciar sua biologia reprodutiva quanto à fecundidade e sazonalidade; entretanto, a insuficiência de dados coletados impossibilita análise mais robusta definitiva (Andrade et al., 2006; Santos, 2013; Colli et al., 2016).

Registro pessoal efetuado sobre oviposição e tamanho de ninhada em Amphisbaena vermicularis Wagler, 1824, contribuiu para ampliação do conhecimento sobre esses animais.

Na perspectiva de superar a lacuna de conhecimentos acerca da biologia reprodutiva de espécies de Amphisbaena, este estudo objetivou efetuar revisão bibliométrica sistematizada para obter informações disponíveis na literatura acerca de aspectos reprodutivos do gênero Amphisbaena nos últimos 20 anos. Portanto, este estudo buscou diminuir lacunas de conhecimento, contribuindo para o direcionamento de pesquisas futuras e possibilitando avanço sobre a história natural desse táxon pouco estudado.

Metodologia

Observação in vivo

Uma fêmea grávida de Amphisbaena vermicularis foi coletada durante resgate de ataque de gato no Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil no dia 4 de dezembro de 2024. Mantida em terrário de vidro, com média de 90 cm de comprimento, 30 cm de largura e 46 cm de altura, coberto com tampa telada e forrado por camada de húmus e folhiço de aproximadamente 5 cm de profundidade (Figura 1). Inicialmente, o indivíduo foi alimentado com pequenos artrópodes como formigas, cupins e tatuzinhos-de-jardin. Além disso, esteve sob supervisão de médica veterinária. Após uma semana desde a coleta a fêmea em observação efetuou postura de ovos dia 11 de janeiro de 2025, possibilitando registro fotográfico e audiovisual, por meio de câmeras fotográficas e smartphones.

Para garantir as condições próximas às ideais para a sobrevivência da fêmea e desenvolvimento dos ovos, foram aferidas temperatura e umidade, utilizando termo-higrômetro e, quando necessário, o terrário foi umedecido para manter os níveis de umidade e temperatura adequados.

O animal examinado, após a ovipostura, morreu e foi incorporado à Coleção Herpetológica da UFRN sob o número de tombo UFRN – CH 7800. Para as medições do comprimento rostro-cloacal (CRC), da cauda (CC) da fêmea e das dimensões dos ovos, foi utilizado paquímetro digital (precisão de 0,1 mm), e para a pesagem, balança de precisão (0,001g).

Revisão bibliométrica

Foram pesquisados artigos sobre biologia reprodutiva e/ou aspectos relacionados à reprodução de espécies do gênero Amphisbaena, utilizando as palavras-chave, como "reprodução", "ciclo reprodutivo", "tamanho de ninhada", "tamanho do ovo", "tamanho de eclosão" e "tempo de incubação", juntamente ao nome de cada espécie correspondente ao gênero (tamanho de ninhada + Amphisbaena vermicularis, p. ex.) entre os anos 2006 e 2026, compreendendo os últimos 20 anos. Teses, dissertações, monografias e TCC's foram considerados pois abordaram aspectos importantes para a biologia reprodutiva de anfisbenas.

A pesquisa das produções científicas foi realizada nas seguintes bases de dados: Scopus, Web of Science, Scielo, e Google Scholar. Para garantir uma maior cobertura bibliográfica, as palavras-chave foram pesquisadas em português, espanhol e inglês. Após essa busca, foi utilizado o método de amostragem em bola de neve estabelecido por Wohlin (2014), a fim de aprimorar o acesso às informações reprodutivas de anfisbenas que não foram encontradas através de palavras-chave buscadas nas bases de dados.

Seguindo a metodologia de Ferreira (2017), foram estabelecidas as categorias de análise "artigo; ano de publicação; periódico; tipo de publicação; tema; país; espécies alvo" a partir de perguntas norteadoras, como: "Quanto a pesquisa científica aumentou ao longo do tempo?; Os artigos vêm sendo publicados em periódicos de relevância?; Quais conteúdos abordados acerca da biologia reprodutiva?; Quais espécies são mais estudadas?; A quais regiões pertencem as anfisbenas mais estudadas?". Estas informações foram tabeladas e submetidas a análises cienciométricas no software Rstudio (R Core Team, 2023).

Posteriormente, os dados reprodutivos adquiridos na busca foram extraídos e padronizados em planilha, para que fossem analisados de forma comparada entre as espécies de anfisbenas. Finalmente, foram identificadas as lacunas sobre a vida reprodutiva desses répteis, exemplificando quais espécies não apresentam dados ou que são subamostradas.

Resultados e Discussões

Observações originais

A fêmea coletada de Amphisbaena vermicularis (CRC = 275 mm; CC = 40 mm), começou a oviposição em 11/10/2024, antes de ser observada; foi possível acompanhar a oviposição do último ovo, que durou cerca de 4 minutos. Ao final da oviposição, foram encontrados seis ovos coriáceos no terrário (Figura 2), ou seja, tamanho de ninhada superior ao conhecimento bibliográfico disponível (Barros-Filho et al., 1996). Esses ovos mediram 20,35 - 22,33 mm de comprimento, 7,76 - 8,73 mm de largura e pesaram 0,9191 - 1,0258 g. A partir de 30 dias de incubação, os ovos foram entrando em artresia; em 45 dias, foi constatada a degeneração de todos os ovos. Entretanto, o possível padrão de tempo de incubação para anfisbênios ovíparos é de cerca de 60 dias (Andrade et al., 2006).

Apesar de não ter sido possível determinar o tempo de incubação dos ovos, provavelmente devido à dificuldade de reprodução em laboratório e as condições naturais necessárias, estes dados são importantes para contribuir com novas informações acerca da reprodução desses animais difíceis de encontrar/observar na natureza.

Revisão bibliométrica

Foram encontrados 16 artigos científicos sobre aspectos reprodutivos de Amphisbaena, publicados em periódicos de diversos países e repositório de universidades, predominantemente nacionais, entre os anos 2006 e 2026. Em adicional, a maioria dos estudos foram realizados no Brasil, que também aparece ao longo de todo o período analisado demonstrando uma grande superioridade na produção científica, que pode ser justificado pela maior concentração destes animais no território brasileiro; estudos pontuais ocorreram na Argentina e no Uruguai. É perceptível que a produção ao longo do tempo é irregular (Figura 3), mostrando um pico em 2017, mas estagnando nos demais anos, sugerindo que esta linha de pesquisa não é sólida, resultando em maiores publicações episódicas e provavelmente específicas de observações pontuais dos autores. O teste de regressão linear mostrou uma tendência de a produção científica diminuir ao longo dos anos, entretanto, este resultado não tem relevância estatística (valor de $p = 0,241$).

Entre as 103 espécies conhecidas do gênero Amphisbaena, foram encontradas apenas 17 (16,50%) informações na literatura acerca dos aspectos reprodutivos destes répteis. As espécies mais estudadas foram (Figura 5): A. alba Linnaeus, 1758; A. darwinii Duméril & Bibron, 1839; A. fuliginosa Linnaeus, 1758; A. kingii (Bell, 1833); A. mertensii Strauch, 1881; citadas em 3 artigos. A. nana Perez & Borges-Martin, 2019; A. roberti, Gans, 1964; A. silvestrii Boulenger, 1902; A. vermicularis; são citadas em 2 artigos. A. anaemariae Vanzolini, 1997; A. anomala (Barbour, 1914); A. brasiliana (Gray, 1865); A. dúbia Müller, 1924; A. heathi Schimidt, 1936; A. nigricauda Gans, 1966; A. pretrei Duméril & Bibron, 1839; A. uroxena Mott, Rodrigues, De Freitas & Silva, 2008; são citadas em 1 artigo. A distribuição de quantos artigos as espécies aparecem está ligado a quantas espécies são estudadas por artigo (Figura 6), que mostra que grande maioria dos trabalhos encontrados aborda apenas uma espécie, entretanto, os trabalhos que abordam múltiplas espécies demonstram mais temas e informações importantes acerca da biologia reprodutiva dos anfisbenídeos (valor de $p = 0,007$). Em adicional, a distribuição geográfica das espécies pode ser uma justificativa para lacunas de conhecimento acerca deste tema, evidenciando que espécies endêmicas ou que ocorrem em poucas localidades são, geralmente, menos amostradas.

Dos trabalhos encontrados, 12 deles compreendem artigos científicos publicados em periódicos, que demonstra um fator positivo pois grande parte do conhecimento está incorporado na literatura científica formal. Apesar disso, grandes achados da biologia reprodutiva foram encontrados em trabalhos acadêmicos (como Santos, 2013), demonstrando a importância de não excluir da análise a literatura acadêmica. Para os artigos científicos, foram observados em quais periódicos foram publicados; Herpetological Review (3), Iheringia Série Zoologia (2), Zootaxa (1), Journal of Herpetology (1), Herpetology Notes (1), Herpetologia Brasileira (1), Herpetological Journal (1), Amphibia-Reptilia (1) e Acta Zoologica (1).

Por fim, os temas mais abordados foram, respectivamente, tamanho de ninhada (11), dimensão dos ovos (9), ciclo reprodutivo (9), estrutura reprodutiva (8), maturidade sexual (7), dimorfismo sexual (6), tamanho de eclosão (3), tempo de incubação (1) e registro de oviposição (1). O gráfico da associação de temas x espécie (Figura 7) mostram que há uma tendência a estudar mais espécies quando múltiplos temas são abordados, facilitando uma maior extração de informações reprodutivas em diferentes áreas de estudo quando possíveis. É possível detectar as lacunas de conhecimento relacionadas ao tema e a espécie no mapa de calor (Figura 8), evidenciando quais espécies carecem de informação dos determinados temas, além de todas as outras espécies congêneres que não entraram nas análises pois não foram encontradas nos trabalhos observados. Uma possível explicação pode ser a facilidade de analisar espécimes de Coleções Científicas para obter dados anatômicos, entretanto, difícil de observar comportamentos relacionados a história natural.

O quadro 1 apresenta os dados coletados de todos os artigos publicados entre 2006 – 2026 e de trabalhos anteriores citados por estes. Foram listadas as espécies, a distribuição geográfica das espécies e as principais informações fornecida pela bibliografia total. Das 103 espécies, foram possíveis obter informações reprodutivas de 18 espécies. O tamanho de ninhada encontrado variou de 1 a 9, sendo o maior valor registrado para A. darwinii.

Conclusão

Conclui-se que os resultados apresentados evidenciam que o conhecimento acerca da biologia reprodutiva de Amphisbaena permanece limitado e fragmentado quanto à distribuição de espécies e áreas temáticas de estudo. Apesar da grande diversidade do gênero, o conhecimento é concentrado em poucas espécies, enquanto as demais carecem de qualquer informação publicada acerca de sua reprodução. A produção científica não foi regular ao longo do tempo, mas se mostrou geograficamente concentrada no Brasil. Os temas mais abordados mostraram que observações de história natural e estudos baseados em espécimes de coleções científicas apresentam papel complementar e fundamental para ampliar o conhecimento sobre a reprodução desses animais, especialmente diante da dificuldade de observação de eventos reprodutivos em condições naturais.

Referências

ABECASSIS, R. F.; SANTOS-JR, A. P.; ESTEVES, L. V. C.; SIQUEIRA-SILVA, A. I.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RIBEIRO, S. Reproduction of Brazilian amphisbaenian Amphisbaena brasiliana (Gray, 1865) (Squamata, Amphisbaenidae). The Herpetological Journal, v. 36, n. 1, p. 49–58, 2026. DOI: 10.33256/36.1.4958.

AGUIRRE, F.D., Ortiz, M.A. & Hernando, A.B. (2017). Testicular cycle of Amphisbaena mertensii Strauch, 1881 (Squamata: Amphisbaenidae) in northeastern Argentina. Herpetological Notes 10, 141–145.

ANDRADE, Denis & Nascimento, Luciana & Abe, Augusto. (2006). Habits hidden underground: A review on the reproduction of the Amphisbaenia with notes on four neotropical species. Amphibia-Reptilia. 27. 207-217. 10.1163/156853806777239995.

BALESTRIN, Rafael & Cappellari, Lize. (2011). Reproduction and feeding ecology of Amphisbaena munoai and Anops kingi (Amphisbaenia, Amphisbaenidae) in the Escudo Sul-Rio-Grandense, southern Brazil. Iheringia. Série Zoologia. 101. 93-102. 10.1590/S0073-47212011000100013.

BARROS-FILHA, J.D. and Nascimento, L.B., 2003. Amphisbaena alba (White-bellied worm lizard). Reproduction. Herp. Rev, 34, pp.243-244.

BERG, C. 1898. Ueber die Eiablage, die Brutpflege und die Nahrung von Amphisbaenia darwini. Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforschen und Aerzte (Leipzig) 69:164–165.

CALCANHOTO, K.K.N. (2013). Biologia reprodutiva de Amphisbaena silvestrii (Boulenger, 1902) (Squamata, Amphisbaenidae) da região do Vale de São Domingos, Mato Grosso, Brasil. Master's Dissertation. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil.

CARREIRA, S.; BALETTA, S. Amphisbaena darwinii darwinii: Reproduction. Herpetological Review, v. 37, n. 1, p. 82–83, 2006.

CASSEL, M., CALCANHOTO, K.K.N., MEHANNA, M., MONTEZOL, M., FERREIRA, A. & MOTT, T. (2017). Spermatogenesis of Amphisbaena silvestrii (Boulenger, 1902): First Report for Amphisbaenidae. Journal of Herpetology 51(1), 109–113.

CELLI, Yasmim Ramos. Biologia reprodutiva de Amphisbaena fuliginosa Linnaeus, 1759 (Amphisbaenia, Amphisbaenidae) no Brasil Central. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2024.

COLLI, Guarino & Zamboni, Dario. (1999). Ecology of the Worm-Lizard Amphisbaena alba in the Cerrado of Central Brazil. Copeia. 1999. 733. 10.2307/1447606.

COLLI, Guarino & Fenker, Jéssica & Tedeschi, Leonardo & Barreto-Lima, André & Mott, Tamí & Ribeiro, Síria. (2016). In the depths of obscurity: Knowledge gaps and extinction risk of Brazilian worm lizards (Squamata, Amphisbaenidae). Biological Conservation. 204. 10.1016/j.biocon.2016.07.033.

FERREIRA, L. C.; Freire, E. M. X. Panorama da produção científica sobre a desertificação no Semiárido brasileiro. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

GANS, C.; ALEXANDER, A. A. Studies on amphisbaenids (Amphisbaenia, Reptilia). Bulletin of the American Museum of Natural History, New York, v. 123, 1962.

GANS, C. Biology of the Reptilia. Vol. 5: Morphology D. New York: Academic Press, 1976.

GANS, C. (1978), The characteristics and affinities of the Amphisbaenia. The Transactions of the Zoological Society of London, 34: 347-416. 10.1111/j.1096-3642.1978.tb00376.x

GANS, C. (2005): Checklist and bibliography of the Amphisbaenia of the world. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 289: 1- 130.

GOELDI, E. A. Die eier von 13 brasilianischen Reptilien, nebst Bemerkungen über Lebens – und Fortpflanzungsweise letzterer. Beobachtungen aus den Jahren 1884-1897. Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Systematik, Oekologie und Geographie der Tiere, v. 10, p. 640-676, 1898.

GORZULA, S., C. Salazar and D. Rendon (1977) Aspects of the ecology of Amphisbaena alba Linnaeus. British Journal of Herpetology, 5: 623-626.

JARED, C.; Antoniazzi, M. M.; Almeida-Santos, S. M. Natural history notes. Leposternon infraorbitale (two-headed snake). Reproduction. Herpetological Review, v. 28, n. 1, p. 44-45, 1997.

JARED, C., de Barros Filho, J. D., Jared, S. G. S., Alexandre, C., Mailho-Fontana, P. L., Almeida-Santos, S. M., & Antoniazzi, M. M. (2023). Peering into the unknown world of amphisbaenians (Squamata, Amphisbaenia): A summary of the life history of Amphisbaena alba. Acta Zoologica, 105, 539–550.

NASCIMENTO, J.B. (2021). Espermatogênese de Amphisbaena pretrei Duméril & Bibron 1839 (Squamata, Amphisbaenidae). PhD thesis. Universidade Federal de Alagoas, Alagoas

NAVEGA-GONÇALVES, M. E. C. Anatomia visceral comparada de seis espécies de Amphisbaenidae (Squamata: Amphisbaenia). Zoologia, v. 26, n. 3, p. 511–526, 2009. DOI: 10.1590/S1984-46702009000300015.

MANGIONE, S., MONTEIRO, R. 2001. The endolymphatic sacs in embryos of Amphisbaena darwini. Journal of Herpetology 35:524–529. doi:10.2307/1565977

MARTINS, Angele. (2024). A note on the reproduction of Amphisbaena anaemariae Vanzolini, 1997 (Squamata: Amphisbaenidae). 10.5281/zenodo.13308208.

MOTT, T.; RODRIGUES, M. T.; DE FREITAS, M. A. Amphisbaena uroxena Mott, Rodrigues, De Freitas and Silva 2008 (Squamata, Amphisbaenidae) shows sexual dimorphism in precloacal pores. Zootaxa, v. 3043, n. 1, p. 33–34, 2011. DOI: 10.11646/zootaxa.3043.1.3.

OLIVEIRA, A. S. Q. A.; GOMES, F. B. R. Amphisbaena brasiliana: Reproduction. Herpetological Review, v. 48, n. 2, p. 432–433, 2017.

OLIVEIRA, C. R.; ROBERTO, I. J.; GONÇALVES-SOUSA, J. G.; ÁVILA, R. W. On the ecology of Amphisbaena heathi (Squamata: Amphisbaenidae) from Northeastern Brazil. Herpetological Review, v. 50, n. 1, p. 62–66, 2019.

PEREZ, R.; Ribeiro, S.; Borges-Martins, M. Reappraisal of the Taxonomic status of Amphisbaena prunicolor (Cope 1885) and Amphisbaena albocingulata Boettger 1885 (Amphisbaenia: Amphisbaenidae). Zootaxa, n. 3550, p. 1-25, 2012.

PRAMUK, J.B., ALAMILLO, H. 2003. An effective technique for collecting Amphisbaena mertensi with notes on its natural history. Herpetological Review 34:221–223.

R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: https://www.r-project.org/. [acessado em 13 de julho de 2025].

SANTOS, L.C. Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) do Brasil. 2013. Tese (Doutorado) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHWARTZ, A., HENDERSON, R.W. 1991. Amphibians and Reptiles of the West Indies: Descriptions, Distributions, and Natural History. 1st ed. University Press of Florida, Florida.

SCHMIDT, K.P. 1921. Contributions to the herpetology of Porto Rico. Annals of the New Yord Academy of Science 28:167–200.

SHINE, Richard. (2005). Life-History Evolution in Reptiles. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36. 23-46. 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152631.

SILVA, Jadna & Navoni, Julio & Freire, Eliza. (2020). Lizards as model organisms to evaluate environmental contamination and biomonitoring. Environmental Monitoring and Assessment. 192. 10.1007/s10661-020-08435-7.

SOUZA E LIMA, F. A. N. de; GASPARINI, J. L.; ALMEIDA, A. P. de; VITAL, M. V. C.; MOTT, T. Sexual dimorphism in Amphisbaena nigricauda (Reptilia, Squamata, Amphisbaenidae) from Southeastern Brazil. Iheringia. Série Zoologia, v. 104, n. 3, p. 299–307, 2014. DOI: 10.1590/1678-476620141043299307.

UETZ, P.; Freed, P.; Hošek, J. The Reptile Database. Disponível em: https://reptile-database.reptarium.cz. Acesso em: 2026.

VANZOLINI, P. (2002). An aid to the identification of the South American species of Amphisbaena (Squamata, Amphisbaenidae). Papéis Avulsos de Zoologia. 42. 351-362. 10.1590/S0031-10492002001500001.

VEGA, Laura. (2001). Reproductive and feeding ecology of the amphisbaenian Anops kingii in East-Central. Amphibia-Reptilia. 22. 447-454. 10.1163/15685380152770408.

Anexos



Figura 1. Terrário utilizado para acondicionar e manter fêmea de Amphisbaena vermicularis.



Tabela 1. Comparação das dimensões dos ovos após oviposição de A. vermicularis.



Figura 2. Ovos de Amphisbaena vermicularis recém postos.



Figura 3. Produção científica sobre biologia reprodutiva do gênero Amphisbaena, 2006-2026.



Figura 4. Produção científica acumulada dentro do período analisado.



Figura 5. Espécies de Amphisbaena que mais aparecem nos artigos analisados.



Figura 6. Associação de espécies de Amphisbaena x artigo.



Figura 7. Relação entre número de espécies x temas reprodutivos.



Figura 8. Heatmap da cobertura temática entre os temas reprodutivos e as espécies.



Quadro 1. Resumo dos dados reprodutivos disponíveis para o gênero Amphisbaena. As espécies estão dispostas em ordem alfabética. Nomeclatura segue Gans, 2005.



Quadro 1. (continuação)



Quadro 1. (continuação 2)



Quadro 1. (continuação 3)

CÓDIGO: SB1599

AUTOR: OSVALDO TORRES TEIXEIRA

COAUTOR: ERICH FERNANDO ESPINELO COSTA

ORIENTADOR: CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

TÍTULO: Avaliação da acessibilidade de recurso digitais em ciências morfológicas

Resumo

A acessibilidade de recursos digitais constitui um componente relevante para a promoção da inclusão no ensino superior, especialmente em áreas que utilizam materiais predominantemente visuais e interativos, como Anatomia, Histologia e Embriologia. Este trabalho apresenta os resultados da primeira etapa de uma pesquisa de Iniciação Científica voltada à avaliação da acessibilidade de recursos digitais em Ciências Morfológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), com atenção à inclusão de estudantes neurodivergentes. A etapa executada concentrou-se no levantamento, leitura e análise de diretrizes legais, institucionais e referenciais científicos relacionados à acessibilidade digital e à educação inclusiva. Foram consultados documentos oficiais e literatura científica, com sistematização dos principais critérios e recomendações para subsidiar a avaliação posterior dos recursos digitais. Como produtos da etapa, foram elaborados um documento-síntese dos marcos legais e conceituais e um quadro comparativo das legislações e recomendações aplicáveis à pesquisa. As etapas posteriores, previstas no plano de trabalho, não puderam ser executadas em razão da greve dos servidores, que impossibilitou a continuidade das atividades necessárias ao levantamento, preparação dos instrumentos e realização da pesquisa de campo. Assim, os resultados apresentados restringem-se à etapa efetivamente realizada e constituem base documental para o prosseguimento da investigação.

Palavras-chave: Acessibilidade digital. Inclusão. Neurodivergência. Ensino superior.

TITLE: Evaluation of the Accessibility of Digital Resources in Morphological Sciences at UFRN

Abstract

Accessibility of digital resources is relevant to inclusion in higher education, particularly in fields that rely heavily on visual and interactive materials, such as Anatomy, Histology, and Embryology. This study presents the results of the first stage of an undergraduate scientific research project focused on evaluating the accessibility of digital resources in Morphological Sciences at the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), with attention to the inclusion of neurodivergent students. The completed stage focused on surveying, reading, and analyzing legal, institutional, and scientific references related to digital accessibility and inclusive education. Official documents and scientific literature were consulted, and their main criteria and recommendations were systematized to support the subsequent assessment of digital resources. The stage resulted in a synthesis document covering legal and conceptual frameworks and a comparative table of legislation and recommendations applicable to the research. The subsequent stages planned in the work plan could not be carried out because a strike by university staff prevented the continuation of the activities required for resource surveying, instrument preparation, and field research. Therefore, the results presented are restricted to the stage actually completed and provide a documentary basis for the continuation of the investigation.

Keywords: Digital accessibility. Inclusion. Neurodiversity. Higher education.

Introdução

A incorporação de tecnologias digitais ao ensino superior tem ampliado as possibilidades de acesso, interação e representação do conhecimento. Nas Ciências Morfológicas, esse processo é particularmente relevante, pois disciplinas como Anatomia, Histologia e Embriologia utilizam recursos como lâminas virtuais, modelos tridimensionais, vídeos, animações e plataformas interativas. Embora esses recursos possam favorecer a aprendizagem, sua utilização não garante, por si só, condições equitativas de acesso. A acessibilidade precisa ser considerada desde a concepção, seleção e disponibilização dos materiais, de modo que diferentes estudantes possam utilizar os conteúdos conforme suas necessidades e formas de processamento das informações. No contexto brasileiro, a inclusão educacional encontra respaldo em marcos legais e normativos. A Lei Brasileira de Inclusão da Pessoa com Deficiência (Lei nº 13.146/2015) estabelece direitos relacionados à acessibilidade e à participação social, enquanto o Decreto nº 9.296/2018 reforça requisitos de acessibilidade aplicáveis a conteúdos e serviços digitais. O Plano Nacional de Educação (PNE 2014–2024), a Política Nacional de Educação Especial na Perspectiva da Educação Inclusiva e a Resolução CNE/CP nº 1/2004 também compõem o conjunto de referências que orientam a promoção de uma educação inclusiva. O plano de trabalho da pesquisa também prevê a consulta a documentos institucionais da UFRN e à produção científica sobre neurodiversidade, tecnologias da informação, educação inclusiva e políticas públicas. A pesquisa insere-se nesse cenário ao propor a avaliação da acessibilidade de recursos digitais utilizados nas Ciências Morfológicas da UFRN, considerando especialmente a inclusão de estudantes neurodivergentes. O estudo mais amplo prevê o levantamento de recursos, a construção de instrumentos de avaliação e a realização de entrevistas e grupos focais. O plano de trabalho estabelece que a investigação seria desenvolvida de maneira sequencial, envolvendo desde a análise documental até a síntese dos resultados e elaboração de relatório técnico. Entretanto, no período considerado neste relatório, foi executada somente a etapa inicial prevista no

planejamento de atividades, correspondente à análise documental e ao referencial teórico. Essa etapa contemplou a pesquisa e leitura das principais diretrizes legais e institucionais sobre acessibilidade digital e inclusão educacional, além do levantamento de artigos científicos relacionados à neurodiversidade, neurodivergências, tecnologias da informação no ensino superior, educação inclusiva, inclusão social e políticas públicas para a educação especial. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é apresentar e discutir os resultados efetivamente obtidos nessa etapa, destacando a sistematização dos marcos legais e conceituais e sua contribuição para a definição dos critérios que deverão orientar a avaliação posterior dos recursos digitais. As etapas subsequentes não foram concluídas devido à greve dos servidores, que impossibilitou a continuidade operacional necessária à pesquisa no período previsto. Assim, este relatório não apresenta resultados de entrevistas, grupos focais ou avaliações empíricas de recursos digitais, evitando atribuir à pesquisa dados que não chegaram a ser coletados.

Metodologia

A pesquisa foi desenvolvida no âmbito de um projeto de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), vinculado ao Departamento de Morfologia, com foco na acessibilidade de recursos digitais utilizados nas Ciências Morfológicas. O plano de trabalho registrado no SIGAA identifica o projeto como voltado à avaliação de recursos digitais em Ciências Morfológicas e à criação de proposta educacional para estudantes neurodivergentes. A execução apresentada neste relatório corresponde à primeira etapa efetivamente realizada segundo o Planejamento de Atividades, denominada “Análise documental e referencial teórico”. Nessa etapa, foram realizadas atividades de pesquisa, leitura, seleção e sistematização de documentos legais, institucionais e científicos relacionados à acessibilidade digital e à inclusão educacional. Inicialmente, realizou-se pesquisa e leitura das principais diretrizes legais e institucionais relacionadas ao tema, incluindo a Lei Brasileira de Inclusão da Pessoa com Deficiência (Lei nº 13.146/2015), o Decreto nº 9.296/2018, o Plano Nacional de Educação 2014–2024, a Resolução CNE/CP nº 1/2004 e documentos institucionais da UFRN. O objetivo foi identificar princípios, direitos, recomendações e requisitos que pudessem posteriormente ser convertidos em critérios para avaliação da acessibilidade dos recursos digitais. Conforme estabelecido no planejamento, foram consideradas fontes oficiais, incluindo o Planalto, o Ministério da Educação e a Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Também foi realizada pesquisa nas principais bases científicas, entre elas PubMed, SciELO e Scopus, além de outras bases pertinentes. A investigação bibliográfica contemplou temas como neurodiversidade, neurodivergências, tecnologias da informação utilizadas no ensino superior, educação inclusiva, inclusão social e educação e políticas públicas para a educação especial. Após a localização das fontes, os conteúdos relevantes foram analisados e sistematizados. Nos documentos normativos, foram destacados os elementos relacionados aos direitos de acessibilidade, inclusão e igualdade de condições de acesso ao conhecimento. Na literatura científica, foram selecionadas contribuições relacionadas às características da aprendizagem, ao uso de tecnologias digitais e às necessidades de estudantes com diferentes formas de processamento de informações. Também fez parte da metodologia prevista a elaboração de fichamentos ou resumos técnicos dos referenciais consultados. A sistematização dos dados foi realizada por meio de tabelas de comparação, permitindo organizar as informações provenientes dos diferentes documentos e identificar pontos de convergência entre legislação, recomendações institucionais e literatura científica. O

planejamento previa ainda discussões semanais com a orientadora para analisar a aplicação dos critérios à pesquisa. Como produtos da etapa realizada, foram previstos e desenvolvidos um documento-síntese, reunindo os principais marcos legais e conceituais sobre acessibilidade, e um quadro comparativo das legislações e recomendações aplicáveis à pesquisa. O documento-síntese foi planejado com aproximadamente quatro a cinco páginas, enquanto o quadro comparativo teve a finalidade de organizar os principais critérios e recomendações identificados durante a análise documental. O plano de trabalho estabelecia outras etapas posteriores, envolvendo levantamento e organização dos recursos digitais, elaboração e preparação de instrumentos de coleta, entrevistas e grupos focais com estudantes neurodivergentes e, posteriormente, integração e análise dos dados. Essas atividades, contudo, não foram executadas no período deste relatório. A continuidade da pesquisa foi impossibilitada pela greve dos servidores, o que comprometeu a realização das atividades institucionais necessárias à execução das etapas subsequentes. Dessa forma, não foram realizadas entrevistas ou grupos focais, não houve coleta de dados diretamente com estudantes e não foram produzidas transcrições ou análises de conteúdo de depoimentos. Consequentemente, os resultados deste trabalho são exclusivamente documentais e bibliográficos, correspondendo à etapa que efetivamente pôde ser executada.

Resultados e Discussões

Levantamento dos referenciais legais e institucionais A primeira entrega da pesquisa consistiu na realização do levantamento e da análise de documentos relacionados à acessibilidade digital e à inclusão educacional. Entre os principais referenciais previstos no planejamento estão a Lei Brasileira de Inclusão da Pessoa com Deficiência (Lei nº 13.146/2015), o Decreto nº 9.296/2018, o Plano Nacional de Educação 2014–2024, a Resolução CNE/CP nº 1/2004 e documentos institucionais da UFRN. A análise desses documentos permitiu reconhecer que a acessibilidade não deve ser compreendida apenas como uma característica técnica isolada dos recursos digitais, mas como parte das condições necessárias para garantir participação e acesso ao conhecimento. No caso das Ciências Morfológicas, a questão assume importância adicional devido à forte utilização de recursos visuais. Sistematização dos critérios de acessibilidade A segunda contribuição da etapa realizada foi a sistematização dos critérios identificados nos documentos analisados. O planejamento estabeleceu que os principais pontos de cada documento deveriam ser resumidos e utilizados para compor posteriormente um checklist de acessibilidade. Entre os aspectos mencionados estão legendas, audiodescrição, contraste adequado, navegação por teclado e linguagem compreensível. A sistematização possibilitou transformar documentos legais e referenciais teóricos amplos em elementos que poderão ser operacionalizados nas etapas posteriores. Referencial relacionado à neurodiversidade Outro eixo identificado durante a primeira etapa foi a relação entre acessibilidade digital e neurodiversidade. O plano de atividades estabeleceu pesquisas sobre neurodiversidade, neurodivergências, tecnologias da informação no ensino superior, educação inclusiva e políticas públicas para a educação especial. Essa perspectiva é importante porque diferentes estudantes podem apresentar formas distintas de processar, organizar e interpretar informações. A literatura selecionada no plano também incluiu obras como O cérebro no mundo digital, de Maryanne Wolf, e Neurociências: desvendando o sistema nervoso, de Bear, Connors e Paradiso. Documento-síntese e quadro comparativo As principais entregas da etapa foram o documento-síntese dos marcos legais e conceituais e o quadro comparativo das

legislações e recomendações aplicáveis à pesquisa. O documento-síntese reuniu os principais referenciais utilizados para compreender a acessibilidade digital no contexto educacional, enquanto o quadro comparativo organizou as diferentes recomendações e identificou elementos comuns entre os documentos analisados. Assim, os resultados obtidos nesta etapa não correspondem ainda a uma avaliação dos recursos digitais da UFRN, mas à construção da base documental necessária para que essa avaliação possa ser realizada posteriormente. Relação dos resultados com os objetivos da pesquisa Considerando que somente a etapa inicial foi realizada, os resultados obtidos atendem parcialmente ao objetivo geral, sobretudo no que diz respeito à construção do fundamento teórico e normativo da investigação. Não seria metodologicamente adequado afirmar que determinado recurso digital é acessível ou inacessível, pois essa conclusão dependeria das etapas de levantamento, avaliação e coleta de informações junto aos usuários. Da mesma forma, não é possível apresentar conclusões sobre as percepções de estudantes neurodivergentes, uma vez que as entrevistas e grupos focais previstos não foram realizados. Limitações decorrentes da interrupção das atividades A principal limitação encontrada durante a execução da pesquisa foi a impossibilidade de continuidade das atividades em razão da greve dos servidores. Essa circunstância impediu a realização das etapas que dependiam da continuidade das atividades institucionais e do desenvolvimento das atividades de campo. Como as atividades posteriores não foram concluídas, o presente trabalho não apresenta resultados referentes à percepção dos estudantes, à aplicação do checklist, à análise de barreiras específicas encontradas nos recursos digitais ou à análise de conteúdo das entrevistas. Essa limitação não invalida os resultados obtidos na primeira etapa, que constituem uma base preparatória para a continuidade do projeto.

Conclusão

A primeira etapa da pesquisa permitiu realizar o levantamento, a leitura e a sistematização de referenciais legais, institucionais e científicos relacionados à acessibilidade digital e à educação inclusiva no ensino superior. Como resultado concreto da etapa realizada, foram desenvolvidos o documento-síntese dos marcos legais e conceituais e o quadro comparativo das legislações e recomendações aplicáveis à pesquisa, produtos estabelecidos no planejamento de atividades. Esses resultados fornecem uma base para a definição dos critérios que deverão orientar a avaliação da acessibilidade dos recursos digitais utilizados nas Ciências Morfológicas. Entretanto, não permitem concluir sobre o grau de acessibilidade dos recursos da UFRN, pois essa avaliação dependeria das etapas posteriores de levantamento, aplicação dos instrumentos e coleta de dados junto aos usuários. As etapas subsequentes não puderam ser executadas em razão da greve dos servidores, que impossibilitou a continuidade das atividades necessárias à pesquisa. Consequentemente, não foram realizadas entrevistas ou grupos focais, nem foram produzidos dados empíricos sobre as experiências de estudantes neurodivergentes. Recomenda-se, para a continuidade do estudo, retomar o levantamento dos recursos digitais utilizados em Anatomia, Histologia e Embriologia, finalizar e validar os instrumentos de coleta, realizar a pesquisa com os participantes previstos e integrar os dados documentais e empíricos.

Referências

BRASIL. Lei nº 13.146, de 6 de julho de 2015. Institui a Lei Brasileira de Inclusão da Pessoa com Deficiência (Estatuto da Pessoa com Deficiência). Diário Oficial da União, Brasília, 7 jul. 2015. Seção 1, p. 2. BRASIL. Ministério da Educação. Política Nacional de Educação Especial na Perspectiva da Educação Inclusiva. Brasília: MEC/SEESP, 2008. BRASIL. Plano Nacional de Educação (PNE) 2014–2024: Lei nº 13.005, de 25 de junho de 2014. Aprova o Plano Nacional de Educação e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 26 jun. 2014. Seção 1, p. 1. BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2017. 1016 p. WOLF, Maryanne. O cérebro no mundo digital: os desafios da leitura na nossa era. São Paulo: Contexto, 2019. 256 p.

CÓDIGO: SB1605

AUTOR: ZAYRA JASMINNE DIAS DE LIMA

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: Predição do perfil de segurança do Orforglipron por abordagens in silico: uma análise integrada de toxicidade e evidências clínicas.

Resumo

A Diabetes Mellitus tipo 2 e a obesidade constituem importantes desafios de saúde pública, impulsionando o desenvolvimento de novas terapias baseadas em incretinas. O Orforglipron é um agonista oral não peptídico do receptor de GLP-1, em desenvolvimento para o tratamento dessas condições. Este estudo avaliou seu perfil toxicológico por abordagens in silico e comparou os achados com evidências clínicas publicadas. A estrutura molecular foi analisada nas plataformas ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0 e Pred-hERG5, contemplando diferentes endpoints de toxicidade. Os principais sinais preditivos envolveram toxicidades respiratória, renal e hepática, além de bloqueio de hERG, neurotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade celular, com diferentes níveis de concordância entre os modelos. A comparação com estudos clínicos mostrou baixa correspondência direta entre esses sinais e os eventos observados em humanos, cujo perfil foi predominantemente gastrointestinal. As predições identificadas não configuram confirmação de toxicidade clínica, mas representam achados relevantes e sinais de alerta para novas investigações experimentais e clínicas, especialmente sobre possíveis efeitos respiratórios, renais e hepáticos durante exposições prolongadas.

Palavras-chave: Orforglipron; ADMET; In Silico; Toxicidade; Modelagem Computacional.

TITLE: Prediction of the Safety Profile of Orforglipron Using In Silico Approaches: An Integrated Analysis of Toxicity and Clinical Evidence

Abstract

Type 2 diabetes mellitus and obesity represent major public health challenges, driving the development of novel incretin-based therapies. Orforglipron is an oral non-peptide glucagon-like peptide-1 receptor agonist currently under development for the treatment of these conditions. This study evaluated its toxicological profile using in silico approaches and compared the predicted findings with published clinical evidence. The molecular structure was analyzed using ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0, and Pred-hERG5, covering multiple toxicity endpoints. The main predictive signals involved respiratory, renal, and hepatic toxicity, as well as hERG blockade, neurotoxicity, genotoxicity, carcinogenicity, and cellular toxicity, with varying levels of agreement across the computational models. Comparison with clinical studies showed limited direct correspondence between these signals and the adverse events observed in humans, which were predominantly gastrointestinal. The identified predictions do not constitute confirmation of clinical toxicity; rather, they represent relevant findings and warning signals that warrant further experimental and clinical investigation, particularly regarding potential respiratory, renal, and hepatic effects during prolonged exposure.

Keywords: Orforglipron; ADMET; In Silico; Toxicity; Computational Modeling.

Introdução

A Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e a obesidade constituem importantes desafios globais de saúde pública devido ao aumento expressivo da prevalência, às complicações metabólicas associadas e ao impacto socioeconômico dessas doenças. Estima-se que mais de 537 milhões de adultos sejam afetados pela diabetes atualmente, com projeção de crescimento contínuo nas próximas décadas, impulsionado principalmente pelo envelhecimento populacional, alterações no estilo de vida e aumento da obesidade [4]. Paralelamente, a obesidade apresenta expansão epidêmica, atingindo mais de 1 bilhão de indivíduos mundialmente e sendo reconhecida como um dos principais fatores de risco para resistência à insulina, desenvolvimento de DM2, doenças cardiovasculares e mortalidade prematura [16]. Dessa forma, o desenvolvimento de terapias capazes de controlar simultaneamente alterações glicêmicas e promover redução de peso tornou-se uma prioridade na farmacologia moderna.

Nesse contexto, as terapias baseadas em incretinas ganharam destaque devido à sua elevada eficácia clínica no tratamento da DM2 e obesidade. O peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) é um hormônio incretínico secretado pelas células enteroendócrinas após a ingestão alimentar, responsável por estimular a secreção de insulina dependente de glicose, reduzir a liberação de glucagon, retardar o esvaziamento gástrico e modular mecanismos centrais relacionados à saciedade [1]. Agonistas do receptor de GLP-1 (GLP-1RAs), como liraglutida e semaglutida, demonstraram benefícios significativos no controle glicêmico e redução ponderal, consolidando essa classe como uma das principais estratégias terapêuticas atuais [5,15]. Entretanto, a predominância de formulações injetáveis e limitações relacionadas ao acesso estimularam a busca por alternativas orais mais convenientes.

O Orforglipron representa uma nova geração de agonistas do receptor de GLP-1, sendo

uma pequena molécula não peptídica desenvolvida para administração oral. Essa característica diferencia o composto dos agonistas incretínicos tradicionais baseados em peptídeos, oferecendo potencial vantagem relacionada à estabilidade química, facilidade de administração e ampliação do acesso terapêutico [11]. Estudos clínicos recentes demonstraram que o Orforglipron apresenta capacidade de reduzir níveis glicêmicos e promover perda de peso em indivíduos com DM2 e obesidade, reforçando seu potencial como uma alternativa inovadora no tratamento dessas condições [3,12].

Apesar dos resultados clínicos promissores, a avaliação de segurança de novas moléculas destinadas ao uso crônico permanece essencial. Medicamentos utilizados continuamente podem apresentar efeitos adversos relacionados ao metabolismo, distribuição tecidual, interações farmacológicas ou toxicidades específicas que nem sempre são identificadas em fases iniciais do desenvolvimento [6]. Nesse cenário, abordagens computacionais in silico têm adquirido relevância na pesquisa farmacêutica por permitirem a predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas antes da realização de estudos experimentais mais complexos.

As análises de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) in silico utilizam modelos computacionais baseados em relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR), inteligência artificial e bancos de dados experimentais para estimar características farmacológicas de candidatos terapêuticos [10]. Essas estratégias possibilitam triagem mais eficiente de moléculas, redução de custos, economia de tempo e diminuição do uso de recursos experimentais, permitindo identificar precocemente possíveis limitações relacionadas à segurança de novos fármacos [2].

Portanto, a avaliação toxicológica in silico do Orforglipron constitui uma abordagem estratégica para investigar potenciais riscos associados ao seu uso prolongado, complementando os dados clínicos disponíveis e contribuindo para uma compreensão mais ampla do perfil dessa nova terapia.

Metodologia

I. Avaliação e caracterização da molécula

Inicialmente, foi realizada uma pesquisa bibliográfica e documental sobre o Orforglipron, considerando sua identificação, finalidade terapêutica, mecanismo de ação e contexto de utilização clínica, com o objetivo de estabelecer os parâmetros necessários para a interpretação de seu perfil toxicológico. A estrutura molecular utilizada nas análises computacionais foi obtida a partir do DrugBank, sendo recuperada em formato SMILES e utilizada como entrada para as ferramentas de predição. A utilização de uma estrutura química padronizada como entrada foi adotada para garantir a correspondência entre a molécula investigada e os modelos computacionais empregados.

II. Avaliação toxicológica in silico

A avaliação computacional da toxicidade foi realizada a partir do SMILES do Orforglipron utilizando diferentes plataformas de predição ADMET, buscando ampliar a cobertura de endpoints e permitir a comparação entre modelos independentes. Foram empregados ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0 e Pred-hERG5,

contemplando diferentes domínios de toxicidade. A seleção das ferramentas considerou a abrangência dos endpoints avaliados e a disponibilidade de informações sobre desempenho dos respectivos modelos.

Os resultados foram organizados em uma matriz contendo o endpoint avaliado, ferramenta empregada, valor ou classificação predita e, quando disponível, informações referentes aos conjuntos de treinamento, teste e validação, e métricas de desempenho: AUC, MCC e R^2. Foram avaliados endpoints relacionados à toxicidade sistêmica, cardiotoxicidade e bloqueio de hERG, toxicidade respiratória, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e lesão hepática induzida por fármacos (DILI), genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, estresse celular, citotoxicidade, hematotoxicidade, imunotoxicidade e toxicidade endócrina. A organização dos resultados por domínio permite preservar tanto a concordância quanto a divergência entre os diferentes modelos, evitando que resultados isolados sejam interpretados como evidência definitiva de toxicidade.

III. Identificação dos preditores relevantes

Após a obtenção das predições, os endpoints foram classificados segundo sua relevância para a exposição sistêmica e o uso terapêutico do Orforglipron, priorizando aqueles relacionados a órgãos e sistemas potencialmente relevantes durante o tratamento. Foram considerados especialmente os preditores de cardiotoxicidade/hERG, hepatotoxicidade/DILI, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade respiratória, genotoxicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade e hematotoxicidade. A priorização considerou a relevância toxicológica do endpoint, a magnitude ou classificação da predição e, principalmente, a concordância ou divergência entre as plataformas. As métricas de desempenho dos modelos foram utilizadas para contextualizar a capacidade preditiva das ferramentas, sem serem consideradas como validação específica da predição para o Orforglipron.

IV. Curadoria das evidências clínicas publicadas

Paralelamente à avaliação computacional, foi realizada uma curadoria de artigos científicos publicados sobre o Orforglipron, priorizando estudos clínicos nos quais fossem descritos eventos adversos, reações adversas, eventos adversos graves, descontinuações relacionadas à segurança, alterações laboratoriais e demais informações associadas à tolerabilidade ou toxicidade da molécula. Foram priorizados estudos clínicos primários e publicações que apresentassem informações diretamente relacionadas à exposição ao Orforglipron. Os dados extraídos foram organizados de acordo com o sistema ou órgão afetado e comparados aos respectivos endpoints preditos in silico.

V. Comparação entre os achados in silico e clínicos

Por fim, os resultados computacionais foram confrontados com as informações de segurança identificadas nos estudos clínicos. Para cada domínio toxicológico, foi avaliada a presença de concordância, concordância parcial, divergência ou ausência de evidência clínica diretamente comparável. Predições corroboradas por eventos descritos em estudos clínicos foram consideradas sinais de maior interesse para discussão, enquanto resultados sem correspondência clínica foram tratados como achados preditivos que requerem interpretação cautelosa. Da mesma forma, a ausência de relatos clínicos compatíveis não

foi interpretada como ausência de toxicidade, mas como ausência de evidência clínica identificada nos estudos avaliados. Dessa forma, a análise foi direcionada à identificação de possíveis correspondências entre os sinais toxicológicos previstos e os eventos observados clinicamente, distinguindo predição computacional de evidência clínica de toxicidade.

Resultados e Discussões

I. Perfil toxicológico in silico do Orforglipron

A avaliação toxicológica in silico do Orforglipron apresentou perfil heterogêneo entre os diferentes endpoints, com maior destaque para toxicidades respiratória, renal e hepática, além de sinais relacionados ao bloqueio do canal hERG, neurotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade celular. A comparação entre as ferramentas permitiu distinguir resultados convergentes daqueles dependentes de modelos específicos, evitando que predições isoladas fossem interpretadas como evidência de toxicidade. Os resultados computacionais foram obtidos pelas ferramentas ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, admetSAR 3.0, Pred-hERG5 e Deep-PK.

A toxicidade respiratória revelou o maior nível de convergência entre os modelos. O ADMETlab 3.0 apresentou probabilidade de 0,887, enquanto o ProTox 3.0 classificou o endpoint como Active e o Deep-PK como Toxic. A concordância entre três plataformas independentes posiciona esse resultado entre os principais sinais identificados. Entretanto, a predição não especifica o fenótipo respiratório, o tecido afetado ou o mecanismo envolvido, devendo ser interpretada como um indicador de risco potencial e não como demonstração de toxicidade pulmonar.

A nefrotoxicidade induzida por fármacos apresentou resultado máximo no ADMETlab 3.0 (1,0) e classificação Active no ProTox 3.0. A concordância entre as duas ferramentas utilizadas para esse endpoint reforça sua priorização dentro do perfil computacional. Apesar disso, a intensidade da predição não permite estabelecer ocorrência de lesão renal em humanos. O resultado indica apenas que o composto apresenta características reconhecidas pelos modelos como compatíveis com potencial nefrotóxico.

Além disso, o perfil hepático também apresentou sinais significativos. O ADMETlab 3.0 classificou a hepatotoxicidade humana com probabilidade de 1,0 e DILI com 1,0, enquanto o ProTox 3.0 classificou a hepatotoxicidade humana como Active. Em contraste, o Deep-PK classificou DILI como Safe. Assim, embora exista concordância para hepatotoxicidade humana entre ADMETlab 3.0 e ProTox 3.0, a avaliação específica de DILI apresentou divergência. Esse comportamento indica que o sinal hepático deve ser considerado relevante, mas com interpretação dependente do endpoint e da ferramenta.

Em relação à cardiotoxicidade, o ProTox 3.0 classificou o endpoint geral como Inactive. Entretanto, os modelos específicos para hERG produziram resultados distintos: o Pred-hERG5 classificou o Orforglipron como “Moderate blocker”, enquanto o ADMETlab 3.0

apresentou probabilidades de 0,960 para hERG blockers e 0,545 para hERG blockers a 10 µM. Portanto, o sinal está relacionado especificamente ao bloqueio de hERG, não podendo ser extrapolado diretamente para cardiotoxicidade global.

A neurotoxicidade apresentou probabilidade de 1,0 no ADMETlab 3.0 e classificação Active no ProTox 3.0. Contudo, entre os alvos neuronais avaliados pelo ProTox 3.0, apenas GABAR apresentou classificação Active, enquanto RYR, NMDAR, AMPAR, KAR, VGSC e AChE foram classificados como Inactive. Dessa forma, o sinal geral de neurotoxicidade não foi acompanhado por um padrão amplo de positividade entre os alvos específicos.

Os resultados relacionados à genotoxicidade foram heterogêneos. O ADMETlab 3.0 apresentou probabilidade de 1,0 para genotoxicidade e 0,981 para mutagenicidade no teste de Ames, enquanto o ProTox 3.0 classificou mutagenicidade como Active. Em contrapartida, o Deep-PK classificou Ames como Safe e o endpoint de micronúcleo como Toxic. Para carcinogenicidade, o ADMETlab 3.0 apresentou probabilidade de 0,973, enquanto ProTox 3.0 classificou o endpoint como Inactive e Deep-PK como Safe. A divergência entre os modelos impede uma conclusão sólida, entretanto justificam investigação complementar.

Quanto à toxicidade celular, foram observadas diferenças entre as linhagens avaliadas. O ADMETlab 3.0 apresentou probabilidades de 0,991 para HEK293 e 0,755 para A549, enquanto a citotoxicidade geral foi classificada como Inactive pelo ProTox 3.0. A elevada predição para HEK293 constitui um achado de interesse no contexto renal, mas não deve ser interpretada diretamente como evidência de nefrotoxicidade sistêmica. Da mesma forma, o resultado para A549 não equivale à demonstração de toxicidade respiratória em humanos. A hematotoxicidade apresentou probabilidade de 0,975, enquanto a citotoxicidade na linhagem RPMI-8226 apresentou 0,813, mas a imunotoxicidade geral foi classificada como Inactive pelo ProTox 3.0.

II. Comparação dos achados in silico com evidências clínicas

A comparação entre os principais sinais computacionais e os estudos clínicos mostrou diferentes níveis de correspondência. Para a toxicidade respiratória, não foram encontradas informações clínicas que permitissem estabelecer uma relação direta com a predição positiva observada no ADMETlab 3.0, ProTox 3.0 e Deep-PK. Os estudos clínicos publicados sobre Orforglipron descrevem majoritariamente eventos gastrointestinais, especialmente náusea, vômito, diarreia e constipação, sem caracterizar um padrão de toxicidade respiratória [3,8,9,12]. Portanto, não foram encontradas informações clínicas quanto a esse parâmetro, e o sinal computacional deve ser considerado um alerta para investigações adicionais.

Para a nefrotoxicidade, também não foram identificadas evidências clínicas que demonstrem lesão renal diretamente induzida pelo Orforglipron. Os estudos clínicos não estabeleceram a nefrotoxicidade como manifestação característica do tratamento [3,8,9,12]. Entretanto, os eventos gastrointestinais observados podem apresentar relação indireta com a função renal, uma vez que vômitos e diarreia podem favorecer perda de volume. Essa possibilidade não caracteriza nefrotoxicidade intrínseca e, portanto, não confirma a predição computacional de lesão renal. O próprio perfil farmacocinético clínico indica que não houve alteração clinicamente relevante da exposição ao

Orforglipron em indivíduos com diferentes graus de comprometimento renal [7]. Assim, o sinal identificado in silico permanece como alerta para investigação específica.

Para hepatotoxicidade e DILI, foram encontradas informações clínicas diretamente relacionadas ao endpoint. Os estudos clínicos monitoraram parâmetros hepáticos e não demonstraram um padrão consistente de lesão hepática associada ao tratamento [3,9,12]. Uma análise agrupada de estudos de fase 3 também não identificou evidência de um padrão de DILI atribuível ao Orforglipron; os casos de elevação de aminotransferases observados apresentaram explicações alternativas e não sustentaram associação causal com o fármaco [14]. Dessa forma, embora o ADMETlab 3.0 tenha apresentado valores de 1,0 para hepatotoxicidade humana e DILI, e o ProTox 3.0 tenha classificado hepatotoxicidade como Active, essas predições não encontram confirmação clínica correspondente na evidência avaliada. O resultado deve, portanto, ser interpretado como sinal preditivo para investigação, e não como demonstração de hepatotoxicidade.

No domínio cardiovascular, os resultados clínicos fornecem informação diretamente relacionada ao principal sinal computacional. Embora Pred-hERG5 tenha classificado o Orforglipron como Moderate blocker e o ADMETlab 3.0 tenha apresentado 0,960 para hERG blockers, o ProTox 3.0 classificou a cardiotoxicidade geral como Inactive. Clinicamente, não foi observada prolongação significativa do intervalo QTc na avaliação de eletrofisiologia cardíaca realizada em exposição correspondente a 1,4 vez a concentração máxima média obtida com a dose máxima recomendada [7]. Assim, não foram encontradas evidências clínicas de cardiotoxicidade que confirmem o sinal específico de hERG. A diferença entre os endpoints reforça que uma predição de bloqueio de canal não deve ser interpretada como evidência clínica de arritmogenicidade.

Quanto à neurotoxicidade, os estudos clínicos relataram eventos como cefaleia, mas não foram encontradas informações que permitissem caracterizá-los como neurotoxicidade induzida pelo Orforglipron [3,8,9,12]. Portanto, o resultado positivo observado no ADMETlab 3.0 e ProTox 3.0 permanece sem confirmação clínica específica.

Os achados clínicos apresentaram, de maneira consistente, predominância de eventos adversos gastrointestinais. No estudo de fase 2 em indivíduos com obesidade ou sobrepeso, os eventos adversos foram majoritariamente gastrointestinais e de intensidade leve a moderada [12]. Em indivíduos com diabetes tipo 2, náusea, vômito, diarreia e constipação também foram os eventos mais frequentes, ocorrendo principalmente durante a escalada de dose [3]. Estudos posteriores de fase 3 mantiveram esse padrão, com eventos gastrointestinais constituindo a principal categoria de eventos adversos e importante causa de descontinuação relacionada à tolerabilidade [9,13]. Esses achados representam o principal perfil de segurança efetivamente documentado clinicamente para o Orforglipron.

Em relação à genotoxicidade, carcinogenicidade e citotoxicidade, não foram encontradas informações clínicas que permitissem confirmar diretamente os sinais observados nos modelos computacionais. Portanto, esses resultados devem ser considerados alertas preditivos, particularmente nos endpoints que apresentaram valores elevados, mas divergência entre ferramentas. A ausência de evidência clínica correspondente não deve ser interpretada como evidência de ausência de toxicidade, mas como ausência de informação clínica identificada para aquele parâmetro.

De forma integrada, os resultados demonstram que os sinais computacionais e o perfil clínico do Orforglipron apresentam pouca sobreposição nos principais endpoints toxicológicos. A toxicidade respiratória foi o resultado mais consistente entre as ferramentas, mas não possui informação clínica diretamente correspondente. A nefrotoxicidade apresentou resultados positivos no ADMETlab 3.0 e ProTox 3.0, sem evidência clínica de lesão renal diretamente atribuível ao fármaco. A hepatotoxicidade apresentou forte sinal computacional, mas os dados clínicos disponíveis não demonstraram padrão de DILI. O sinal de hERG também não foi acompanhado por evidência clínica de prolongamento significativo do QTc. Em contraste, os eventos adversos mais frequentemente observados nos estudos clínicos foram predominantemente gastrointestinais, sem que esse padrão tenha constituído o principal sinal identificado pela avaliação computacional [3,7–9,12–14].

Essa diferença demonstra que as predições computacionais e os dados clínicos fornecem informações complementares. Enquanto os estudos clínicos descrevem eventos efetivamente observados durante a exposição humana, os modelos in silico permitem priorizar endpoints que podem não apresentar manifestação clínica evidente nos estudos disponíveis. Dessa forma, os sinais identificados devem ser interpretados como hipóteses toxicológicas para investigação, especialmente quando há concordância entre diferentes ferramentas, e não como confirmação de eventos adversos ou toxicidades.

Considerando que o Orforglipron está sendo desenvolvido para condições que demandam tratamento contínuo, a identificação desses sinais é particularmente relevante para o acompanhamento da segurança sob exposição prolongada. Dessa forma, as predições In Silico auxiliam no fluxo de priorização, permitindo que estudos futuros foquem em predições que apresentam maiores sinais de alerta, além de contribuir para a identificação precoce de eventos que não são suficientemente caracterizados nos estudos clínicos iniciais.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a avaliação toxicológica in silico do Orforglipron identifica sinais de segurança relevantes, porém heterogêneos entre os diferentes modelos computacionais. Os principais alertas concentraram-se nos domínios respiratório, renal e hepático, além de sinais relacionados ao bloqueio de hERG, neurotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade celular. A toxicidade respiratória apresentou a maior convergência entre ferramentas, enquanto nefrotoxicidade e hepatotoxicidade também se destacaram pela concordância parcial entre modelos independentes. Em contrapartida, alguns endpoints, como DILI, carcinogenicidade e mutagenicidade, apresentaram divergências importantes, evidenciando a necessidade de interpretação integrada das predições.

A comparação com os estudos clínicos mostrou baixa correspondência direta entre os principais sinais computacionais e os eventos observados em humanos. Não foram identificadas evidências clínicas que confirmassem toxicidade respiratória ou nefrotoxicidade diretamente atribuível ao Orforglipron. Da mesma forma, os sinais preditivos de hepatotoxicidade e bloqueio de hERG não foram acompanhados, até o

momento, por um padrão clínico consistente de DILI ou por prolongamento significativo do intervalo QTc. O perfil de segurança documentado clinicamente foi predominantemente gastrointestinal, com ocorrência de náusea, vômito, diarreia e constipação, sobretudo durante a escalada de dose.

Nesse contexto, as predições de toxicidade identificadas neste estudo constituem achados relevantes e devem ser consideradas sinais de alerta para o direcionamento de novas investigações sobre a segurança do Orforglipron. Embora não representem confirmação de toxicidade clínica, esses resultados permitem destacar endpoints que merecem avaliação experimental e clínica mais específica, especialmente aqueles relacionados aos sistemas respiratório, renal e hepático. Assim, os dados obtidos podem contribuir para o planejamento de estudos futuros voltados à caracterização dos mecanismos, da magnitude e da relevância biológica desses potenciais efeitos, sobretudo em condições de exposição prolongada. Dessa forma, a abordagem in silico mostra-se útil como estratégia de triagem e priorização de riscos, complementando as evidências clínicas disponíveis e auxiliando no aprofundamento da avaliação de toxicidade e segurança do Orforglipron.

Referências

[1] DRUCKER, D. J. Mechanisms of action and therapeutic application of glucagon-like peptide-1. Cell Metabolism, v. 27, n. 4, p. 740-756, 2018. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.001

[2] EKINS, S. et al. Exploiting machine learning for drug discovery and development. Nature Materials, v. 18, p. 435-441, 2019. https://doi.org/10.1038/s41563-019-0338-z

[3] FRIAS, J. P. et al. Efficacy and safety of oral orforglipron in patients with type 2 diabetes: a multicentre, randomised, dose-response, phase 2 study. The Lancet, v. 402, n. 10400, p. 472-483, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01302-8.

[4] INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 10. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.

[5] NAUCK, M. A. et al. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes. Molecular Metabolism, v. 46, 101102, 2021. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101102.

[6] PIRES, D. E. V. et al. pkCSM: predicting pharmacokinetic and toxicity properties. Journal of Medicinal Chemistry, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104

[7] PRATT, E. J. et al. Effect of food consumption on the pharmacokinetics, safety, and tolerability of once-daily orally administered orforglipron (LY3502970), a non-peptide GLP-1 receptor agonist. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 26, n. 5, p. 1852-1861, 2024. DOI: https://doi.org/10.1111/dom.15435.

[8] PRATT, E. J. et al. Orforglipron (LY3502970), a novel, oral non-peptide glucagon-like peptide-1 receptor agonist: a phase 1a, blinded, placebo-controlled, randomized, single- and multiple-ascending-dose study in healthy participants. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 25, n. 9, p. 2634-2641, 2023. DOI: https://doi.org/10.1111/dom.15184.

[9] ROSENSTOCK, J. et al. Orforglipron, an oral small-molecule GLP-1 receptor agonist, in early type 2 diabetes. The New England Journal of Medicine, v. 393, p. 1065-1076, 2025. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMoa2505669.

[10] SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. Pharmacological Reviews, v. 66, n. 1, p. 334-395, 2014. https://doi.org/10.1124/pr.112.007336.

[11] URVA, S. R. et al. LY3502970, a novel oral nonpeptide GLP-1 receptor agonist. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 24, p. 1181-1192, 2022. https://doi.org/10.1111/dom.15184

[12] WHARTON, S. et al. Daily oral GLP-1 receptor agonist orforglipron for adults with obesity. The New England Journal of Medicine, v. 389, n. 10, p. 877-888, 2023. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMoa2302392.

[13] WHARTON, S. et al. Orforglipron, an oral small-molecule GLP-1 receptor agonist for obesity treatment. The New England Journal of Medicine, v. 393, p. 1796-1806, 2025. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMoa2511774.

[14] WHARTON, S. et al. Hepatic safety of orforglipron in adults with obesity or overweight and/or type 2 diabetes: a pooled analysis of the Orforglipron Phase 3 clinical trials. Diabetes, Obesity and Metabolism, v. 28, n. 9, p. 8347-8358, 2026. DOI: https://doi.org/10.1111/dom.71032.

[15] WILDING, J. P. H. et al. Once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity. The New England Journal of Medicine, v. 384, p. 989-1002, 2021. https://doi.org/10.1056/nejmoa2032183

[16] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight: key facts. Geneva: World Health Organization, 2024.

Anexos



Tabela 1- Principais predições toxicológicas in silico do Orforglipron.



Figura 1- Heatmap das principais predições toxicológicas in silico do Orforglipron.

CÓDIGO: SB1615

AUTOR: RAFAEL MELO FERNANDES DE MIRANDA

ORIENTADOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

TÍTULO: Fenologia de Eugeniinae (Myrtaceae) na Mata Atlântica – Fase 2

Resumo

Eugenia azeda Sobral é uma espécie lenhosa endêmica do Nordeste brasileiro, restrita ao RN e CE, de alto valor socioeconômico e nutricional. Está classificada como quase ameaçada na Lista Vermelha da IUCN devido à pressão antrópica. Este estudo caracterizou sua fenologia reprodutiva e avaliou a congruência temporal entre dados de herbários virtuais (JABOT e speciesLink), ciência cidadã (iNaturalist) e monitoramento de campo. Foram analisados 111 registros validados (56 de herbários e 55 do iNaturalist) comparados ao acompanhamento de 30 indivíduos em Macaíba/RN. As fontes revelaram um padrão fenológico congruente e sazonal: botões florais (agosto-outubro), antese concentrada (outubro-dezembro) e pico de maturação de frutos (dezembro-fevereiro). Enquanto o monitoramento de campo registrou com precisão fenofases efêmeras e sincronia local, os dados digitais permitiram detectar frutos imaturos e refletiram fielmente as trajetórias fenológicas da espécie. A integração de coleções biológicas e ciência cidadã mostrou-se eficaz e complementar, fornecendo subsídios consistentes para a conservação e o manejo sustentável da espécie.

Palavras-chave: Eugenia azeda; Fenologia reprodutiva; Ciência cidadã; Herbários

TITLE: Phenology of Eugenia azeda Sobral (Myrtaceae): testing congruence between herbarium and field data.

Abstract

Eugenia azeda Sobral is a woody species endemic to Northeastern Brazil, restricted to the states of RN and CE, with significant socioeconomic and nutritional value. It is currently classified on the IUCN Red List as near threatened due to anthropic pressure. This study characterized its reproductive phenology and evaluated the temporal congruence between data from virtual herbaria (JABOT and speciesLink), citizen science (iNaturalist), and field monitoring. We analyzed 111 validated records (56 from herbaria and 55 from iNaturalist) and compared them with the monitoring of 30 individuals in Macaíba/RN. The sources revealed a congruent and seasonally marked phenological pattern: floral buds (August–October), concentrated anthesis (October–December), and peak fruit maturation (December–February). While field monitoring

recorded ephemeral phenophases and local synchrony with greater precision, digital data allowed for the detection of immature fruits and faithfully reflected the species' phenological trajectories. The integration of biological collections and citizen science proved effective and complementary, providing consistent subsidies for the conservation and sustainable management of the species.

Keywords: Eugenia azeda; Reproductive phenology; Citizen science; Herbarium

Introdução

Eugenia azeda Sobral (Sobral, 2010) é uma espécie lenhosa endêmica do Nordeste do Brasil (Mazine et al., 2020), de distribuição extremamente restrita, conforme avaliações realizadas pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (Martinseeli et al., 2013). Sua ocorrência foi registrada , apenas nos estados do Ceará (municípios: Aquiraz, Aracati e Eusébio) e do Rio Grande do Norte (Ceará-Mirim, Extremoz, Ielmo Marinho, Macaíba, Macau, Maxaranguape, Natal, Nísia Floresta, Parnamirim, Pureza, Rio do Fogo, São Miguel do Gostoso e Touros). Embora seu valor já seja amplamente reconhecido por comunidades tradicionais que utilizam seus frutos para consumo, produção de geléia e sucos, sendo inclusive a fruta mais comercializada nas feiras locais do RN (Sousa ,2019), a ubaia-azeda foi formalmente conhecida pela ciência apenas em 2010 quando foi descrita pelo botânico Marcos Sobral. Do ponto de vista bioquímico a ubaia azeda se destaca pela sua elevada acidez natural (pH < 3,3) com baixa relação de sólidos solúveis totais por acidez total titulável (SST/ATT), uma característica desejável para a indústria de polpas e bebidas, e com grande potencial nutracêutico, visto que seus teores de ácido ascórbico (Vitamina C) ultrapassam os 1.500 mg/100g, posicionando-a como uma fonte relevante de compostos bioativos funcionais (Vieira et al. 2020). Atualmente, devido ao cenário de vulnerabilidade que a espécie enfrenta como resultado da elevada pressão antrópica, principalmente, em prol da expansão imobiliária costeira e do turismo desenfreado (Sobral, 2010), a espécie foi considerada como quase ameaçada pela IUCN (Amorim & Gomes, 2023) e requer ações de pesquisa acerca de suas tendências, sua fenologia e números populacionais, para disponibilizar seu conhecimento e garantir seu monitoramento ambiental e sua conservação para futuras gerações. Portanto, nesse contexto é imprescindível avaliar e disponibilizar dados sobre a sua fenologia em prol da sua conservação e do fornecimento de subsídios confiáveis para a coletas de seus frutos, sementes e para a manutenção genética de suas populações frente às transformações ambientais, validando-se do acervo histórico que o herbário se constitui para aferir sua capacidade de refletir com precisão a dinâmica fenológica observada in loco. Além dos registros de herbário, dados de reprodução disponíveis em plataformas de ciência cidadã configuram como um recurso metodológico de alto valor científico. A participação da população na obtenção de dados fenológicos padronizados permite estruturar séries temporais robustas e geograficamente abrangentes, as quais também são usadas para monitorar alterações nos ciclos biológicos causadas pelas mudanças climáticas (Primack et al. 2009). Assim, este projeto continuará o plano de trabalho anterior que visou compilar dados de floração para espécies de Eugeniinae na Mata Atlântica baseado em registros de herbário e testar a congruência entre dados obtidos em campo e herbário. Estes dados serão utilizados no projeto PVA22165-2024 - Fenologia e mudanças climáticas: quais as previsões para o futuro das plantas da Mata Atlântica? - para futuramente explorar os efeitos do aquecimento global na reprodução e distribuição desta espécie. Objetivos 1) Caracterizar a fenologia de floração e

frutificação de Eugenia azeda; 2) Avaliar a congruência na fenologia reprodutiva de E. azeda entre os registros de herbário, aqueles vindos de plataforma de ciência cidadã (iNaturalist) e dados obtidos em campo.

Metodologia

Coleta dos dados: Foram coletados dados de 3 fontes distintas, (1) dados de campo, advindos do trabalho de conclusão de curso de Moreira (2019); (2) dados de coletas passadas obtidos através de plataformas digitais que armazenam imagens de exsicatas depositadas em herbários Jabot (https://jabot.jbrj.gov.br/v3/consulta.php) e Specieslink (https://specieslink.net/); e (3) dados de fotografia em campo armazenadas na plataforma de ciência cidadã iNaturalist (https://www.inaturalist.org/). Os dados de Moreira (2019) foram coletados na Escola Agrícola de Jundiaí em Macaíba-RN, durante o período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019, quinzenalmente. O método de coleta empregado foi o de classes de Fournier (1974), método semi-quantitativo padronizado que estima visualmente a intensidade das fenofases em plantas observando o percentual da copa com as estruturas desejadas presentes e medido através de uma escala de 0 a 4. Nessa escala, a classe 0 indica a ausência da fenofase (0%), a classe 1 representa presença com intensidade de 1% a 25% da fenofase presente na copa, a 2 abrange de 26% a 50%, a 3 de 51% a 75% e a 4 indica intensidade de 76% a 100%. Quando a coleta de dados iniciou a espécie já estava reproduzindo e portanto não usamos os 24 meses de dados disponíveis, optamos por fazer um recorte temporal que abarcasse um ciclo reprodutivo completo e para isso consideramos os meses de junho de 2018 a maio de 2019. Para obtenção dos dados de herbário utilizamos o termo Eugenia azeda nas plataformas (Jabot e Specieslink), e filtrados a registros que constavam com a data, local de coleta e imagem digitalizada da exsicata, resultando em 56 registros do JABOT e 36 do spLink. O conjunto de dados passou por uma etapa de limpeza e filtragem, na qual foram excluídos 33 registros duplicados, 2 registros não apresentavam data ou coordenadas geográficas válidas e 1 registro de um exemplar cultivado fora de seu habitat natural. Ao final desse processo, restaram 56 registros válidos para a análise, distribuídos entre as bases JABOT (36) e speciesLink (20). Para obtenção das imagens do iNaturalist procuramos por Eugenia azeda o que resultou em 36 registros verificados ao nível de pesquisa, para aumentar o numero da amostragem filtramos para a inclusão de registros não verificados, e após a devida identificação taxonômica dos mesmos, obtivemos 55 registros da plataforma. As fenofases (botão, antese, fruto imaturo e fruto maduro) foram identificadas através da inspeção visual nas exsicatas digitalizadas ou registros fotográficos em campo (Fig. 1). Botões florais foram considerados do surgimento do botão até antes da abertura das pétalas; antese, da abertura das flores até a queda total das pétalas e anteras; frutos imaturos, da queda das anteras até o fruto verde sem sinais de maturação visíveis, e frutos maduros foram considerados os frutos amarelos, brilhantes com tamanho típico da espécie. Foram considerados os registros ao longo de toda a área de distribuição da espécie, sendo filtrados apenas aqueles que continham imagens. Os dados textuais, fenológicos e as imagens provenientes de herbários foram tabulados, limpos e associados juntamente aos dados advindos da ciência cidadã e de Moreira (2019), para o Microsoft Excel, onde as variáveis fenológicas foram compiladas e calculadas. O banco de dados final foi restrito a registros validados por taxonomistas experientes, com a unificação de duplicatas e a correção de inconsistências de georreferenciamento. Análise do dados: Após a limpeza do banco de dados, as coordenadas geográficas dos registros foram importadas para o

software QGIS para a elaboração do mapa de distribuição geográfica da espécie. A distribuição temporal das fenofases foi estimada através de estatística circular (Staggemeier et al. 2020) e os parâmetros descritivos básicos (média, variância e sazonalidade) foram extraídos para representar a espécie. A sincronia populacional foi estimada com base na quantidade de registros encontrados ao longo do tempo e representada pelo comprimento do vetor r (o qual varia de 0 a 1; Morellato et al. 2010). Todas as análises foram executadas por meio do pacote circular (Agostinelli & Lund, 2023). A congruência entre dados de herbário e campo foi avaliada através da sobreposição dos parâmetros fenológicos estimados por cada fonte de dados com foco na data média e variância.

Resultados e Discussões

Os dados de campo revelam que a espécie apresenta em sua maioria indivíduos que se reproduzem apenas uma vez ao ano (53% de 30 indivíduos), mas 40% dos indivíduos reproduziu 2 vezes e um único indivíduo reproduziu três vezes, houve um indivíduo na população observada que nunca reproduziu. A produção de botões e flores foi altamente sincronizada como resultado da rápida conversão de botões em flores. Os indivíduos que reproduziram mais de uma vez, ofertaram botões e flores entre julho e setembro, mas a maior sincronia populacional foi observada em dezembro quando estes indivíduos manifestaram sua segunda floração e todo o restante da população floriu (Fig. 3). Frutos imaturos foram encontrados de agosto de 2018 até meados de março de 2019, com maior intensidade entre os meses de dezembro de 2018 a fevereiro de 2019 (Fig. 3). Frutos maduros estiveram disponíveis de meados de dezembro a meados de março com maior concentração em fevereiro (90% dos indivíduos). As 2 plataformas (herbário e ciência cidadã) contribuíram com 147 registros de Eugenia azeda com imagens sendo 55 do iNaturalist, 56 do JABOT e 36 do spLink. Após a remoção de duplicatas (N=33) e registros em cultivo, sem data ou sem coordenada geográfica (N=3) obtivemos 111 registros (55 iNaturalist, 36 JABOT e 20 spLink). Os dados de herbários reforçam a ocorrência dela nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, mas os registros do iNaturalist ampliam sua ocorrência para o estado da Paraíba também (Fig. 2). A primeira coleta depositada em herbário da espécie foi em 1951 (Fig. 3), na ocasião identificada apenas ao nível de família e posteriormente recebeu incorretamente o nome de Eugenia punicifolia. A espécie foi conhecida pela ciência apenas quando foi descrita por Marcos Sobral em 2010, até esse ano haviam 17 registros, a partir daí houve um aumento de mais de três vezes no número de coletas que hoje chega em 56 registros tombados em herbários (Fig. 3). Paralelamente, a plataforma de ciência cidadã iNaturalist impulsionou de forma expressiva o conhecimento sobre a espécie a partir de 2016, somando 54 registros fotográficos quase igualando o volume total acumulado pelo meio acadêmico. Os dados de herbário e do iNaturalist apresentaram data médias de atividade próximas das relatadas no dado de campo mas com maior variância, provavelmente em função da maior cobertura geográfica e temporal destes dados. Discussão Os achados revelam uma alinhada congruência temporal entre a amostragem em campo, os dados provenientes de herbários digitais (JABOT e speciesLink) e os registros fornecidos pela ciência cidadã via iNaturalist. As três abordagens convergiram para um padrão reprodutivo bem definido: o pico de floração ocorre no segundo semestre (concentrando a antese entre outubro e dezembro), enquanto a maturação dos frutos aparece síncrona ao verão (dezembro a fevereiro) com pico de produção em fevereiro nas 3 fontes de dados. Essa convergência entre as metodologias reforça que as

coleções botânicas e a ciência cidadã expressam o comportamento fenológico in situ, afirmando-se como fontes de informação altamente eficazes e complementares para o estudo da fenologia em espécies de distribuição geográfica restrita. A variação geográfica da Eugenia azeda está presente na explicação das diferenças observadas nos gráficos fenológicos entre as bases de dados analisadas (Fig. 4). Enquanto o monitoramento in situ reflete a dinâmica da população local restrita ao município de Macaíba/RN, os dados dos herbários virtuais (JABOT e speciesLink) e da plataforma de ciência cidadã (iNaturalist) integram registros de múltiplos pontos ao longo de todo o litoral e interior do Rio Grande do Norte e do litoral do Ceará. Essa maior abrangência espacial (Fig. 2) influência as métricas da estatística circular, como o comprimento do vetor médio (r). No conjunto de dados de campo, foram constatados valores de r mais elevados (r = 0,9 em fase de frutos maduros e r = 0,6 em frutos imaturos), evidenciando expressiva sazonalidade populacional. Os dados de herbários e do iNaturalist exibiram vetores médios de menor comprimento (r = 0,3 para a maioria das fenofases), o que reflete menor sazonalidade aparente e maior dispersão temporal dos eventos reprodutivos. Esse padrão de menor concentração temporal nas bases digitais não está relacionado à inconsistência metodológica, e sim ao fato de abranger diferentes populações em ambientes e condições diferentes ao longo da costa. Os dados de campo captam a intensidade de um evento local, enquanto os registros digitalizados demonstram um mosaico fenológico abrangente da espécie. A influência dessas variações espaciais será explorada em estudos futuros e modelos preditivos subsequentes voltados ao impacto das mudanças ambientais sobre a distribuição de Eugenia azeda. O histórico de registros de Eugenia azeda (Fig. 3) reflete diretamente o impacto de sua descrição formal em 2010. Antes disso, a espécie passou por um longo período sem ser amostrada em campo. A publicação de sua devida identificação permitiu a identificação da espécie por especialistas e impulsionou um salto de mais de três vezes no número total de registros. A partir de 2016, a ciência cidadã (iNaturalist) acelerou o acúmulo desses dados, superando as coletas botânicas tradicionais e expandindo o conhecimento fenológico da espécie

Conclusão

Eugenia azeda apresenta um padrão fenológico reprodutivo sazonal anual bem marcado, caracterizado por uma floração concentrada no segundo semestre com dois pulsos distintos: um primeiro evento menor e menos síncrono entre julho e setembro, e um pico massivo e explosivo de antese entre outubro e dezembro. A frutificação exibe desenvolvimento longo de frutos imaturos (agosto a março) e maturação síncrona ao período do verão (janeiro a fevereiro, com pico em fevereiro), provavelmente sincronizando a oferta de frutos com o início do período chuvoso. Existe alta congruência temporal entre dados de campo, herbários virtuais e ciência cidadã, validando a acurácia dos herbários digitalizados e do iNaturalist para identificar as datas médias e trajetórias reprodutivas gerais de espécies lenhosas tropicais. As diferenças na sazonalidade da planta nas diferentes fontes de dados se dão por conta da escala geográfica: os dados de campo expressam a forte sincronia de uma população local e enquanto os herbários e o iNaturalist sintetizam o mosaico fenológico resultado da variação climática e ambiental ao longo do litoral do RN e CE. Apesar deste mosaico a disponibilidade de frutos maduros foi altamente sincrônica ao longo da distribuição da espécie. A integração entre coleções biológicas e ciência cidadã é uma ferramenta confiável e de muita utilidade para ampliar a amostragem espaço-temporal, sendo útil

para definir épocas de coleta de sementes e modelagens preditivas frente às mudanças climáticas para Eugenia azeda.

Referências

Amorim, E. & Gomes, M. 2023. Eugenia azeda. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T218546118A218546120. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T218546118A218546120.pt. Accessed on 26 August 2026. Chambers, L. E., Altwegg, R., Barbraud, C., Barnard, P., Beaumont, L. J., Crawford, R. J., ... & Wolfaardt, A. C. (2013). Phenological changes in the southern hemisphere. PloS one, 8(10), e75514. PRIMACK, R. B. et al. The role of citizen science in phenological research. International Journal of Biometeorology, v. 53, n. 6, p. 473–477, 2009. DOI: 10.1007/s00484-009-0260-2. SOUZA, Alice Medeiros. Contribuições da agricultura familiar na preservação dos conhecimentos sobre plantas alimentícias não convencionais na região metropolitana de Natal/RN. 2019. Fenner, M. (1998). The phenology of growth and reproduction in plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 1(1), 78-91. Flora e Funga do Brasil. Eugenia. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10338>. Acesso em: 30 abr. 2024. Gressler, E., Pizo, M. A., & Morellato, L. P. C. (2006). Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. Brazilian Journal of Botany, 29, 509-530. Mendoza, I., Peres, C. A., & Morellato, L. P. C. (2017). Continental-scale patterns and climatic drivers of fruiting phenology: A quantitative Neotropical review. Global and Planetary Change, 148, 227-241. Morellato, L. P. C., Alberti, L. F., & Hudson, I. L. (2010). Applications of circular statistics in plant phenology: a case studies approach (pp. 339-359). Springer Netherlands. Morellato, L. P. C., Alberton, B., Alvarado, S. T., Borges, B., Buisson, E., Camargo, M. G. G., ... & Peres, C. A. (2016). Linking plant phenology to conservation biology. Biological conservation, 195, 60-72. Oliveira-Filho, A. T., & Fontes, M. A. L. (2000). Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. Biotropica, 32(4b), 793-810. Fournier, L.A. (1974) Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. Turrialba, 24, 422-423. Parmesan, C., & Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. nature, 421(6918), 37-42. Parmesan, C. (2007). Influences of species, latitudes and methodologies on estimates of phenological response to global warming. Global change biology, 13(9), 1860-1872. Sheldon, K. S. (2019). Climate change in the tropics: ecological and evolutionary responses at low latitudes. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 50, 303-333. Proença, C. E., Filer, D. L., Lenza, E., Silva, J. S., & Harris, S. A. (2012). Phenological Predictability Index in BRAHMS: a tool for herbarium-based phenological studies. Ecography, 35(4), 289-293. Silva, J. S., & Proença, C. E. B. (2014). Padrões fenológicos no Distrito Federal: congruência entre dados de herbário e estudos em campo. Heringeriana, v. 6, n. 1, p. 87–89, 2014. Staggemeier, V. G., Diniz-Filho, J. A. F., & Morellato, L. P. C. (2010). The shared influence of phylogeny and ecology on the reproductive patterns of Myrteae (Myrtaceae). Journal of ecology, 98(6), 1409-1421. Staggemeier, V. G., Diniz-Filho, J. A. F., Zipparro, V. B., Gressler, E., de Castro, E. R., Mazine, F., ... & Morellato, L. P. C. (2015). Clade-specific responses regulate phenological patterns in Neotropical Myrtaceae. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 17(6), 476-490. Staggemeier, V. G., Cazetta, E., & Morellato, L. P. C. (2017). Hyperdominance in fruit production in the Brazilian Atlantic

rain forest: the functional role of plants in sustaining frugivores. Biotropica, 49(1), 71-82. Staggemeier, V. G., Camargo, M. G. G., Diniz-Filho, J. A. F., Freckleton, R., Jardim, L., & Morellato,L. P. C. (2020). The circular nature of recurrent life cycle events: a test comparing tropical and temperate phenology. Journal of Ecology, 108(2), 393-404.

Anexos



Figura 1. Fenofases de Eugenia azeda avaliadas no campo(A-D) e através da análise de imagens de exsicatas(E-H) em herbários. Crédito das imagens: Hercilia Cunha (A-D); Jabot (E, F, G e H).



Figura 4. Padrões fenológicos para cada uma das fontes de dados, distribuição circular, vetor de sazonalidade e data média.



Gráfico (A)



Gráfico(B)



Gráfico (C) Fig. 5 distribuição mensal das fenofases reprodutivas advindas de herbários(A) Plataforma de Ciência Cidadã INaturalist(B) e dados de campo(C)



Figura 2. Mapa de distribuição da Eugenia azeda com dados trabalhados



Figura 3. Distribuição temporal dos registros de E.azeda nas diferentes fontes de dados.

CÓDIGO: SB1619

AUTOR: BEATRIZ SILVA DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: ANA CAROLINA LUCHIARI

TÍTULO: O Impacto Comportamental da Exposição Precoce ao Etanol em Danio rerio Juvenis via Teste do Desvio

Resumo

Introdução: A exposição gestacional ao etanol provoca sérios prejuízos ao neurodesenvolvimento. O zebrafish (Danio rerio) destaca-se como modelo promissor para investigar o Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF) devido à elevada conservação biológica. Objetivos: Investigar os efeitos comportamentais de longo prazo da exposição aguda embrionária ao etanol em zebrafish. Método: Embriões (linhagem AB) foram expostos ao etanol (0 ou 1%) por 2h às 24h pós-fertilização. Aos 3 meses, foram avaliados no Teste do Tanque Novo (locomoção e ansiedade) e no Teste do Desvio (memória de trabalho e funções executivas). O rastreio ocorreu via Any-maze e a análise estatística no R ($p < 0,05$; CEUA UFRN 062/2023). Resultados: No Tanque Novo, o etanol a 1% induziu fenótipo tipo-ansioso, aumentando o tempo no fundo ($p = 0,015$; $d = 0,80$), sem comprometer a locomoção ou freezing ($p > 0,05$). No Teste do Desvio, houve maior variabilidade no grupo etanol e tendência descritiva à maior latência (62,3 vs. 42,3 s) e AUC ($p = 0,068$), porém sem prejuízo estatístico na aprendizagem (ANOVA: $p = 0,093$) ou na navegação espacial (PERMANOVA: $p = 0,131$). Conclusão: A exposição precoce ao etanol induziu ansiedade (geotaxia) persistente na vida adulta, sem comprometer a locomoção ou o aprendizado no desvio, reafirmando o zebrafish como modelo relevante para o TEAF.

Palavras-chave: Álcool, Comportamento, Geotaxia, Neurotoxicologia, Zebrafish, TEAF.

TITLE: The Behavioral Impact of Early Ethanol Exposure in Juvenile Danio rerio via the Detour Task

Abstract

Introduction: Gestational exposure to ethanol causes serious neurodevelopmental impairments. The zebrafish (*Danio rerio*) stands out as a promising model for investigating Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) due to high biological conservation. Objectives: To investigate the long-term behavioral effects of acute embryonic ethanol exposure in zebrafish. Method: Embryos (AB strain) were exposed to ethanol (0% or 1%) for 2 hours at 24 hours post-fertilization. At 3 months of age, they were evaluated using the Novel Tank Test (locomotion and anxiety) and the Detour Test (working memory and executive functions). Tracking was performed using Any-maze, and statistical analysis was conducted in R ($p < 0.05$; UFRN Ethics Committee CEUA 062/2023). Results: In the Novel Tank Test, 1% ethanol induced an anxiety-like phenotype, increasing time spent at the bottom ($p = 0.015$; $d = 0.80$) without compromising locomotion or freezing behavior ($p > 0.05$). In the Detour Test, the ethanol group showed greater variability and a descriptive trend toward increased latency (62.3 vs. 42.3 s) and AUC ($p = 0.068$), though without statistically significant impairment in learning (ANOVA: $p = 0.093$) or spatial navigation (PERMANOVA: $p = 0.131$). Conclusion: Early ethanol exposure induced persistent anxiety (geotaxis) in adulthood without compromising locomotion or detour learning, reaffirming the zebrafish as a relevant model for FASD.

Keywords: Alcohol, Behavior, Geotaxis, Neurotoxicology, Zebrafish, FASD.

Introdução

O consumo de álcool (etanol) constitui um fenômeno global com profundas implicações para a saúde pública. Embora os efeitos deletérios do uso crônico dessa substância em indivíduos adultos sejam amplamente documentados, a vulnerabilidade do sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento é significativamente superior. Quando a exposição ocorre durante o período gestacional, o etanol atua como um potente agente teratogênico, podendo resultar no Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF). O TEAF compreende uma gama de anomalias que variam desde malformações craniofaciais e restrição de crescimento até déficits cognitivos, motores e comportamentais severos que persistem ao longo da vida. Alterações na expressão gênica durante os estágios iniciais da embriogênese podem estabelecer uma cascata de mudanças moleculares persistentes, modificando a função cerebral permanentemente (FERNANDES, 2014).

Nesse cenário, o peixe-zebra (Danio rerio) consolidou-se como um modelo animal poderoso para o estudo do TEAF. A espécie apresenta vantagens metodológicas notáveis, tais como alta fecundidade, embriões transparentes que viabilizam o imageamento in vivo e, crucialmente, uma homologia genômica de 70% a 82% em relação aos genes humanos associados a doenças (FERNANDES; LOVELY, 2021).

Dentre as funções executivas vitais afetadas pelo TEAF, destaca-se a flexibilidade cognitiva, que confere aos organismos a capacidade de ajustar o comportamento e tomar decisões eficientes em resposta a mudanças ou desafios ambientais (SOUZA, 2024). Essa flexibilidade depende do equilíbrio entre comportamentos flexíveis direcionados a metas e respostas automatizadas de hábito; evidências mostram que a exposição precoce ao etanol acelera a transição para comportamentos habituais rígidos em peixe-zebra (PARKER et al., 2016). Adicionalmente, a exposição precoce ao álcool acarreta prejuízos na memória de trabalho espacial e na aprendizagem associativa de Danio rerio, revelando que mesmo exposições de curta duração em estágios iniciais do desenvolvimento provocam danos cognitivos permanentes (FERNANDES et al., 2014; SCHAIDHAUER et al., 2022). Do ponto de vista neuroquímico, estudos apresentam que a exposição ao etanol está associada à redução da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, afetando a motivação necessária para o aprendizado e a flexibilidade comportamental (FERNANDES; LOVELY, 2021), prejudicando os circuitos de recompensa e motivação necessários para o aprendizado. Adicionalmente, a droga altera o transporte de glutamato e a ligação aos receptores NMDA, comprometendo a execução de comportamentos complexos, como a coesão do cardume (shoaling), o que se traduz em isolamento social e prejuízos de sociabilidade (FACCIOL; GERLAI, 2020; SCHAIDHAUER et al., 2022).

Para investigar tais fenótipos complexos, o Detour Task surge como uma ferramenta metodológica refinada de triagem comportamental. A resolução desse teste exige o recrutamento de circuitos neurais associados às funções executivas, demandando simultaneamente plasticidade sináptica para o aprendizado de novas rotas, controle inibitório e um sistema de recompensa regulado. Logo, a execução com excelência no Detour Task depende intrinsecamente da integridade de sistemas moleculares envolvidos na plasticidade neural e na neurotransmissão. Comportamentalmente, o teste consiste em apresentar barreiras físicas que bloqueiam o caminho direto até uma meta desejada, exigindo que o animal contorne o obstáculo para obter a recompensa (Souza, 2024). Ao introduzir e aumentar gradualmente o número de barreiras, este paradigma permite avaliar dimensões complexas da cognição animal.

Espera-se que a exposição precoce ao etanol induza um fenótipo comportamental distinto em relação ao grupo controle na vida juvenil, quantificável pelos testes propostos, e correlacionado a alterações na expressão de genes de interesse no neurodesenvolvimento.

Metodologia

Esta pesquisa realizou-se no Laboratório de Peixes Ornamentais (FishLab) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

1. Animais, Exposição e Condições de Manutenção

Empregavam-se embriões de Danio rerio (linhagem AB), obtidos a partir da reprodução em biotério. Mantiveram-se os reprodutores sob condições controladas de temperatura (28 °C), pH (~6,8), condutividade adequada e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

No protocolo de exposição, submeteram-se os embriões, às 24 horas pós-fertilização (hpf), a um período de 2 horas de contato com etanol nas concentrações de 0% e 1%. Esse intervalo correspondeu a uma janela crítica do neurodesenvolvimento, caracterizada por intensa neurogênese e diferenciação neuronal. O estudo contou com dois grupos experimentais: o grupo controle, exposto apenas à água do sistema (0%), e o grupo etanol, exposto ao álcool diluído na água do sistema na concentração de 1%. Selecionaram-se tais concentrações com base em estudos prévios sobre o Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF) em zebrafish, os quais demonstraram a indução de alterações neurocomportamentais sem elevada mortalidade embrionária. Após a exposição, lavaram-se os embriões com água do sistema, mantendo-os sob condições padrão de biotério até atingirem a fase juvenil (3 meses de idade).

2. Teste do Tanque Novo

Para a realização do experimento, utilizou-se o quantitativo de 40 animais (n = 20 por grupo). Aos 3 meses de idade, identificaram-se os peixes numericamente, os quais permaneceram em recipientes individuais que permitiam a comunicação visual e química (por meio de feromônios). Transferiu-se cada indivíduo para um aquário de teste em acrílico transparente com dimensões aproximadas de 24× 8 × 20 cm, contendo 3 L de água do sistema, virtualmente dividido em três zonas horizontais de mesmo tamanho: inferior (fundo), intermediário (meio) e superior (topo). Registrou-se o comportamento de exploração vertical e a atividade natatória continuamente.

3. Teste do Desvio (Detour Task)

Após o teste inicial, os animais submeteram-se à tarefa de desvio de obstáculo. Inicialmente, treinaram-se os peixes para percorrer a extensão de um aquário, 150 × 25 × 25 cm, a fim de interagir com um grupo conspecífico ao final do aparato. Os animais cumpriram duas sessões diárias de treinamento durante dois dias consecutivos. Em seguida, introduziram-se barreiras opacas com aberturas para bloquear parcialmente o acesso ao estímulo social, tornando a navegação mais desafiadora. Efetuaram-se os testes duas vezes ao dia, nos períodos da manhã (8h) e da tarde (13h). Quando o peixe ultrapassava a barreira em até 60 segundos e alcançava o grupo social nos 240 segundos restantes, adicionava-se uma nova barreira na tentativa seguinte, atingindo um total de até 7 barreiras superadas. O teste avaliou a motivação do Danio rerio na busca por um objetivo, bem como os efeitos da exposição embrionária ao etanol sobre a flexibilidade cognitiva e o controle inibitório na fase juvenil. Mensuraram-se a latência para ultrapassar as barreiras, o número de barreiras superadas, o tempo total para a conclusão da tarefa e a quantidade de tentativas necessárias.

4. Análise Estatística

Tabularam-se e analisaram-se os dados comportamentais obtidos no software Any-maze no ambiente R (RStudio). Verificou-se a normalidade e a homogeneidade das variâncias para determinar o uso de testes paramétricos (como ANOVA de uma via seguida pelo

teste post-hoc de Tukey) ou não paramétricos (como o teste de Kruskal-Wallis). Consideraram-se as diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussões

Conforme ilustrado na Figura 1, a exposição ao etanol a 1% induziu um perfil comportamental do tipo ansiogênico no Teste do Tanque Novo, sem comprometer a capacidade locomotora geral dos animais. A distância percorrida, a velocidade média e o tempo de freezing não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nem divergências nas medidas de tendência central (médias e medianas) entre os grupos. As distribuições e os quartis mantiveram-se sobrepostos em ambos os tratamentos. A manutenção desses parâmetros demonstra que a dose de 1% de etanol não causou sedação, congelamento excessivo nem prejuízo motor, validando as análises dos parâmetros direcionados à ansiedade. O grupo tratado com etanol a 1% permaneceu por mais tempo no fundo do tanque em comparação ao Controle, evidenciado pelo aumento significativo no tempo de fundo ($p = 0,015$; $d = 0,80$), com menor sobreposição dos quartis e mediana superior no grupo etanol. Quanto à latência para explorar o topo pela primeira vez, embora o grupo etanol tenha apresentado uma tendência a demorar mais para ascender à zona superior (mediana superior e presença de outliers próximos a 290 s), a diferença não foi estatisticamente significativa no teste de Mann-Whitney ($p = 0,298$). Esse resultado é atribuído à elevada variabilidade intra-grupo e à presença de outliers extremos que inflaram a dispersão.Em conjunto, esses dados indicam um padrão de perfil tipo ansioso: os peixes priorizam a permanência no fundo (zona de proteção / geotaxia) e reduzem a exploração da área superior (exposta e aversiva), sem a interferência de déficits motores ou sedativos. Esse achado converge com o protocolo consolidado de ansiedade em peixe-zebra (Danio rerio), no qual a preferência pela zona inferior reflete respostas defensivas de estresse (Egan et al., 2009; Levin et al., 2007). Embora doses baixas de etanol (ex: 0,25% a 0,5%) frequentemente promovam efeitos ansiolíticos ou hiperlocomoção (Gerlai et al., 2000; Rosemberg et al., 2011), exposições na faixa de 1% podem ultrapassar o limiar de ansiólise e induzir ansiedade ou estresse comportamental, dependendo do tempo de exposição e da linhagem utilizada (Tran et al., 2016).

Ao analisar a curva de aprendizado ao longo das sessões de treino (T1 a T4), o grupo tratado com etanol a 1% apresentou latência média geral descritivamente 47% maior em comparação ao grupo Controle (62,3 s vs. 42,3 s), acompanhada de variância superior (2468 vs. 833). A análise gráfica da distribuição dos dados via Q-Q Plot confirmou essa dispersão no grupo etanol, evidenciada pelo desvio da normalidade teórica e pela presença de outliers acentuados nos treinos T1 e T4, com valores entre 150s e 250s. Apesar das diferenças descritivas na média e na variabilidade, a Análise de Variância (ANOVA) não revelou diferenças estatisticamente significativas para os fatores testados: efeito de Grupo ($p = 0,093$), Treino ($p = 0,454$) e interação Grupo times Treino ($p = 0,428$).A disparidade observada nas métricas descritivas demonstra maior heterogeneidade comportamental sob o efeito do etanol a 1%: enquanto parte dos animais manteve desempenho similar ao Controle, outros apresentaram latências acentuadamente elevadas para atingir o estímulo social. O fator Grupo aproximou-se do limiar de significância ($p = 0,093$), contudo, a expressiva variabilidade intra-grupo elevou o erro amostral e impediu a rejeição da hipótese nula. Em síntese, embora os

dados descritivos indiquem uma tendência comportamental de maior latência e a ausência de um padrão claro de habituação no grupo submetido ao etanol, o elevado grau de dispersão individual impede a confirmação estatística de prejuízo na aquisição de aprendizado nas condições avaliadas.A literatura descreve que a exposição ao etanol afeta processos de consolidação de memória e atenção de forma dose-dependente (Blackwell et al., 2021). A ausência de prejuízo estatisticamente significante, combinada ao aumento da variância, pode refletir diferenças interindividuais na susceptibilidade aos efeitos neuroquímicos do álcool ou flutuações na motivação social durante as sessões (Ladu et al., 2014).

A análise da área sob a curva (AUC) revelou um aumento descritivo na exposição acumulada para o grupo submetido ao tratamento com etanol a 1% em relação ao grupo Controle (Figura 3). O grupo tratado apresentou mediana visivelmente superior (linha central da caixa próxima a 105) em comparação ao Controle (mediana próxima a 65), exibindo maior concentração de dados em valores elevados de AUC. Por sua vez, o grupo Controle demonstrou uma distribuição interquartil mais dispersa nas faixas inferiores (entre 40 e 90).Apesar das diferenças descritivas observadas nas medianas, a comparação univariada via teste de Mann-Whitney/Wilcoxon apontou apenas uma tendência marginal de diferença entre as distribuições ($p = 0,068$). Complementarmente, a análise multivariada de variância permutacional (PERMANOVA) confirmou a ausência de separação estatisticamente significativa entre os centróides dos grupos ($F = 2,517$; $p = 0,131$), sendo que o fator tratamento (nível de exposição) explicou apenas 6,2% da variação total dos dados ($R^2 = 0,062$). A avaliação da AUC integrada ao longo do experimento sugere uma alteração biológica caracterizada pelo aumento da resposta acumulada nos sujeitos expostos ao etanol a 1%.Contudo, sob a ótica da inferência estatística rigorosa (alpha = 0,05), nem o teste de Wilcoxon ($p = 0,068$) nem a PERMANOVA ($p = 0,131$) permitiram rejeitar a hipótese nula. Essa divergência entre o padrão gráfico visível e a significância formal é explicada pela ampla sobreposição dos limites de distribuição (whiskers) e pela amplitude interquartil observada em ambos os tratamentos. Ademais, o valor de $R^2 = 0,062$ obtido na PERMANOVA demonstra que a maior parte da variabilidade total da amostra decorre de diferenças individuais intrínsecas. O poder estatístico moderado, associado ao tamanho amostral ($N = 20$), atuou como fator limitante para a detecção de diferenças sutis, um achado comum em testes comportamentais com amostragem moderada (Champagne et al., 2010). Sugere-se que experimentos futuros ampliem o número de sujeitos por grupo para verificar se essa tendência de elevação da AUC ganha suporte estatístico conclusivo.

A análise da distribuição espacial dos centróides por sujeito (Figura 4), definidos pelas coordenadas de posição espacial do Centróide Dia versus Centróide Porta, revelou forte sobreposição comportamental entre os grupos Controle e 1% etanol. Os centróides individuais de ambos os tratamentos encontraram-se intermesclados ao longo do espaço bidimensional, sem a formação de agrupamentos (clusters) distintos por tratamento. Os centróides médios de cada tratamento situam-se em posições praticamente equivalentes no centro da nuvem de dados. A avaliação da homogeneidade de dispersão multivariada através do teste betadisper não indicou diferença significativa na variabilidade espacial em torno dos centróides médios entre os dois grupos ($p = 0,878$). Além disso, observou-se uma tendência positiva comum em ambas as condições, na qual a elevação do Centróide Dia acompanhou o incremento no Centróide Porta.A proximidade entre os centróides médios dos grupos e a ampla interpenetração das observações individuais confirmam a ausência de um efeito significativo da exposição ao etanol a 1% sobre a

localização espacial média dos sujeitos no paradigma, corroborando os achados da PERMANOVA (p = 0,131). A confirmação da homogeneidade de dispersão pelo teste betadisper (p = 0,878) valida metodologicamente a inferência da PERMANOVA, garantindo que a ausência de significância estatística não foi mascarada por heterocedasticidade multivariada.A relação diretamente proporcional observada entre o Centróide Dia e o Centróide Porta em ambos os tratamentos aponta para um padrão contínuo de navegação e habituação espacial ao longo do tempo. Como essa trajetória ocorreu em magnitude equivalente nos dois grupos, sugere-se que o processo gradual de habituação e uso do espaço manteve-se preservado, sem que a concentração de 1% de etanol alterasse substancialmente a dinâmica de navegação espacial ou a preferência de escolha ao longo dos dias de teste.

É importante evidenciar que os achados da curva de aprendizado e da AUC (Figuras 2 e 3) podem ser interpretados à luz do mesmo princípio de dose- e tempo-dependência que explica as respostas comportamentais no Tanque Novo. Chacon e Luchiari (2014) demonstraram que os efeitos do etanol sobre o aprendizado associativo em peixe-zebra não são lineares: doses baixas (0,10%) não prejudicam o desempenho nem induzem comportamento de busca pela droga, enquanto doses mais altas (1,00%), tanto em exposição aguda quanto crônica, passam a comprometer a aquisição de tarefas e gerar prejuízo cognitivo. Esse padrão reforça a existência de uma janela dose-dependente em que baixas concentrações de etanol são neutras ou facilitadoras, enquanto concentrações de 1% tendem a interferir nos processos cognitivos de habituação e memória.Esse mecanismo ajuda a explicar por que o grupo etanol partida de uma latência inicial elevada em T1, resultado do perfil ansiogênico agudo observado no Tanque Novo (maior permanência no fundo e hesitação exploratória), e não conseguiu sustentar a mesma trajetória de melhora que o Controle ao longo das sessões, culminando no aumento de latência em T4 e em uma maior AUC acumulada. Ou seja, o mesmo tratamento que intensifica respostas defensivas agudas (maior tempo de fundo) pode, com a exposição repetida ao longo das sessões de treino, comprometer a consolidação da aprendizagem necessária para atingir o estímulo social. Esse padrão é consistente com o descrito por Fernandes et al. (2014), que observaram ausência de preferência aprendida em peixes expostos ao álcool, que atuaram de modo indistinguível do acaso sem que houvesse alterações na atividade locomotora ou na motivação alimentar, afastando explicações puramente motoras para o déficit. Assim, conclui-se que o etanol atua de forma dependente da dose e da duração da exposição sobre diferentes domínios comportamentais, intensificando respostas ansiosas agudas e comprometendo cumulativamente a aprendizagem associativa. Essa interpretação é coerente com o efeito bifásico descrito por Chacon e Luchiari (2014) e reforça que a concentração de 1% pode ter manifestações distintas a depender do paradigma testado. Observa-se, assim, a formação de subgrupos de resposta (indivíduos vulneráveis vs. resistentes), cuja diferenciação estatística poderá ser melhor evidenciada em estudos futuros com maior tamanho amostral (N).

Conclusão

Em conjunto, os achados deste estudo demonstram que a exposição aguda ao etanol a 1% durante a janela crítica da neurogênese embrionária (24 hpf) induz alterações comportamentais persistentes até a fase adulta em zebrafish. O tratamento provocou um

aumento marcante em comportamentos defensivos no Teste do Tanque Novo, evidenciado pelo aumento da geotaxia (tempo no fundo), sem que houvesse prejuízo locomotor ou efeito sedativo que comprometesse a validação desse parâmetro. Por outro lado, a avaliação das funções executivas no Teste do Desvio indicou que o déficit provocado pela exposição precoce manifesta-se predominantemente no componente de ansiedade e reatividade ao estresse, mantendo a aprendizagem e a navegação espacial estatisticamente preservadas, a despeito do aumento da variabilidade individual. Esses dados validam o zebrafish como um modelo translacional sensível para a investigação da programação fetal e dos efeitos de longo prazo do Transtorno do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF).

Como perspectiva e continuidade desta pesquisa, busca-se avançar da caracterização fenotípica para a elucidação dos circuitos neurobiológicos subjacentes a essas respostas. Uma vez que a resolução do Teste do Desvio (Detour Task) exige a integridade de vias de plasticidade neural, controle inibitório e sinalização monoaminérgica, as próximas etapas investigarão se a exposição embrionária ao etanol modula a expressão de genes-chave de neuroplasticidade (bdnf e c-fos), da neurotransmissão dopaminérgica (th1 e drd1b) e gabaérgica (gad1b) imediatamente após a execução da tarefa.

Essa abordagem prospectiva fornecerá evidências sobre as bases moleculares da neurotoxicidade do etanol, estabelecendo uma ponte direta entre o perfil de expressão gênica em centros de processamento superior e a flexibilidade cognitiva em adultos expostos precocemente ao álcool.

Referências

Facciol, A., & Gerlai, R. (2020). Zebrafish shoaling, its behavioral and neurobiological mechanisms, and its alteration by embryonic alcohol exposure: A review. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 14, 572175. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.572175

Fernandes, Y., & Lovely, C. B. (2021). Zebrafish models of fetal alcohol spectrum disorders. Genesis, 59(11), e23460. https://doi.org/10.1002/dvg.23460

Fernandes, Y., Tran, S., Abraham, E., & Gerlai, R. (2014). Embryonic alcohol exposure impairs associative learning performance in adult zebrafish. Behavioural Brain Research, 265, 181–187. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.035

Souza, J. F. de. (2024). Entre a proteção e a ameaça: Efeitos da exposição ao filtro UV oxibenzona no peixe donzela (Stegastes fuscus) [Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte]. https://repositorio.ufrn.br/items/f7f202f8-5c8b-4e04-8642-1a7b904f29a3

Schaidhauer, F. G., Caetano, H. A., Silva, G. P. da, & Silva, R. S. da. (2022). Contributions of zebrafish studies to the behavioural consequences of early alcohol exposure: A systematic review. Current Neuropharmacology, 20(3), 579–593. https://doi.org/10.2174/1570159X19666210428114317

CACHAT, Jonathan M. et al. Understanding the behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. Behavioural Brain Research, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19540270/

CHACON, Diana M.; LUCHIARI, Ana C. Uma dose para os mais sábios basta: os benefícios do álcool para a aprendizagem associativa em peixes-zebra. Progressos em Neuropsicofarmacologia e Psiquiatria Biológica, v. 53 https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278584614000621

Anexos



Figura 1. Comparação entre os grupos Controle e Etanol 1% no teste do Tanque Novo (Novel Tank Test) para as variáveis: distância percorrida, velocidade média, tempo de freezing, latência até o topo, tempo de fundo e distância média do fundo.



Figura 2. Curva de aprendizado ao longo dos quatro treinos (T1–T4) para os grupos Controle e 1% etanol. Os pontos representam a latência média (s) em cada treino e as barras de erro indicam o erro padrão da média.



Figura 3. Área sob a curva (AUC) da latência ao longo dos treinos, comparando os grupos Controle e 1% álcool. Os boxplots representam mediana, quartis e valores mínimo/máximo de cada grupo.



Figura 4. Distribuição dos centroides individuais (Centroide Dia × Centroide Porta) para os grupos Controle e 1% álcool. Os pontos pequenos representam cada animal e os pontos grandes indicam o centroide médio de cada grupo



Figura Extra 2.1. Latência de treino

CÓDIGO: SB1629

AUTOR: MATEUS AMARAL DA SILVA

COAUTOR: MARCIA VITORIA FERNANDES FERREIRA

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Diversidade de Moscas-das-Frutas (Diptera: Tephritidae), seus Parasitoides e entomofauna na Zona de Proteção Ambiental 2 (ZPA-2) - Parque Estadual das Dunas de Natal "Jornalista Luiz Maria Alves"

Resumo

RESUMO

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) possuem grande relevância ecológica e econômica. Este trabalho caracterizou a diversidade de Tephritidae, seus parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) e plantas hospedeiras na ZPA-2 (Parque Estadual das Dunas de Natal e Tabuleiro Litorâneo). Entre fev/2025 e ago/2026, coletaram-se frutos em áreas públicas e trilhas. Amostraram-se 30 espécies botânicas (18 famílias), sendo que 15 (em 7 famílias, destaque para Myrtaceae) apresentaram emergência. Emergiram 658 Tephritidae (293 fêmeas e 365 machos) de seis espécies: *Anastrepha fraterculus*, *A. obliqua*, *A. serpentina, A. sororcula*, *A. macrura* e a exótica *Ceratitis capitata*. *Anastrepha serpentina* foi a mais abundante (221 indivíduos, em *Manilkara salzmannii*), seguida por *A. fraterculus* (220, em 9 hospedeiros). Destacam-se os novos registros de associação: Pradosia restingae para *A. macrura*, *Byrsonima crassifolia* para *A. sororcula*, e *M. salzmannii* como hospedeira simultânea de quatro tefritídeos. Recuperaram-se 22 parasitoides: *Doryctobracon areolatus* (14) e *Opius bellus* (8). As outras 15 espécies botânicas não apresentaram emergência. O estudo evidencia a ZPA-2 como refúgio de Tephritidae nativas e exóticas, subsidiando o monitoramento fitossanitário regional.

Palavras-chave: Anastrepha; Braconidae; Ceratitis capitata; Unidade de Conservação Urb

TITLE: Diversity of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae), Their Parasitoids, and Entomofauna in Environmental Protection Zone 2 (ZPA-2) – “Jornalista Luiz Maria Alves” State Park of Natal

Abstract

Fruit flies (Diptera: Tephritidae) are of major ecological and economic importance. This study characterized the diversity of Tephritidae, their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae), and host plants in ZPA-2 (Natal Dunes State Park and Coastal Tableland). Between Feb/2025 and Aug/2026, fruits were collected in public areas and trails. A total of 30 botanical species (18 families) were sampled, 15 of which (in 7 families, mainly Myrtaceae) yielded insect emergence. A total of 658 Tephritidae emerged (293 females and 365 males) across six species: *Anastrepha fraterculus*, *A. obliqua, A. serpentina, A. sororcula, A. macrura*, and the exotic *Ceratitis capitata. Anastrepha serpentina* was the most abundant (221 individuals on *Manilkara salzmannii*), followed by *A. fraterculus* (220 on 9 hosts). New association records stand out: *Pradosia restingae* for *A. macrura*, *Byrsonima crassifolia* for *A. sororcula*, and *M. salzmannii* as a simultaneous host for four tephritids. Twenty-two parasitoids were recovered: *Doryctobracon areolatus* (14) and *Opius bellus* (8). The remaining 15 botanical species showed no emergence. The study highlights ZPA-2 as a refuge for native and exotic Tephritidae, supporting regional phytosanitary monitoring.

Keywords: Anastrepha; Braconidae; Ceratitis capitata; Urban Conservation Unit; T

Introdução

As moscas-das-frutas verdadeiras, pertencentes à família Tephritidae (Diptera), constituem insetos frugívoros de elevada importância ecológica e econômica. Na região Neotropical, o gênero nativo *Anastrepha* Schiner, 1868 e a espécie exótica *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) concentram grande parte das espécies de importância agrícola, associando-se a diferentes plantas hospedeiras (ZUCCHI, 2000; ALUJA; MANGAN, 2008). Esses insetos provocam danos principalmente durante o desenvolvimento larval nos frutos, comprometendo sua qualidade, reduzindo a produção comercial e aumentando os custos de controle. As perdas econômicas causadas pelos tefritídeos são expressivas, sendo estimadas em mais de US$ 2 bilhões anuais no mundo, enquanto, no Brasil, as perdas diretas na produção e os custos de monitoramento e controle variam entre US$ 120 e US$ 200 milhões por ano (ZUCCHI; MALAVASI, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). No Rio Grande do Norte, o monitoramento é estratégico para a manutenção do status de Área Livre de Praga para *Anastrepha grandis* (Macquart, 1846), favorecendo a exportação de cucurbitáceas (ARAÚJO; FERNANDES, 2021). A ecologia das moscas-das-frutas está diretamente relacionada às interações com plantas hospedeiras e inimigos naturais. As fêmeas selecionam frutos para oviposição, nos quais

as larvas se desenvolvem, estabelecendo associações de diferentes graus de especificidade. No Rio Grande do Norte, há diversas associações entre Tephritidae e plantas cultivadas e nativas, e a sazonalidade dos frutos influencia sua dinâmica populacional (ARAÚJO; MEDEIROS; SILVA; ZUCCHI, 2005; ARAÚJO; FERNANDES, 2023). Paralelamente, parasitoides da família Braconidae constituem importantes inimigos naturais dos tefritídeos, contribuindo para a regulação populacional e o controle biológico natural (ARAÚJO; ZUCCHI; CANAL, 1996; ARAÚJO; FERNANDES, 2023). A análise conjunta dessas interações permite compreender a estrutura de redes tróficas em ambientes naturais.

Nesse contexto, a Zona de Proteção Ambiental 2 (ZPA 2), correspondente ao Parque Estadual Dunas de Natal "Jornalista Luiz Maria Alves" e à área de Tabuleiro Litorâneo adjacente, apresenta elevada relevância para a conservação da biodiversidade em Natal. O Zoneamento Ambiental de Natal destaca a ZPA 2 pela diversidade de sua flora, fauna e paisagens naturais, caracterizando-a como unidade de conservação destinada a finalidades educativas, recreativas, culturais e científicas (NATAL, 2008). Como unidade de conservação, contribui para a proteção dos ecossistemas, da flora, da fauna e dos recursos genéticos, além de favorecer pesquisas científicas e monitoramento (RIO GRANDE DO NORTE, 1977). Inserido na matriz urbana, constitui importante remanescente de vegetação natural, sustentando diferentes organismos e interações ecológicas. A relevância desse ambiente para o estudo dos tefritídeos também se relaciona às lacunas de conhecimento sobre plantas nativas que atuam como hospedeiras em áreas de vegetação natural e sobre a dinâmica dessas associações em Zonas de Proteção Ambiental urbanas (BASÍLIO, 2026).

Diante da importância dos tefritídeos, da função de seus parasitoides e da necessidade de ampliar o conhecimento sobre interações entre insetos e plantas, torna-se relevante investigar a comunidade da ZPA 2. Persistem lacunas sobre a composição e as interações de moscas-das-frutas em áreas protegidas urbanas, especialmente quanto aos hospedeiros nativos (BASÍLIO, 2026). Assim, este trabalho tem como propósito caracterizar a diversidade de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) na ZPA 2, identificando as espécies presentes, suas associações com plantas hospedeiras e os registros de parasitismo, contribuindo para o conhecimento da entomofauna local, das relações tróficas e do controle biológico natural, além de fornecer subsídios para ações de monitoramento e conservação da biodiversidade no Parque Estadual Dunas de Natal.

Metodologia

ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Zona de Proteção Ambiental 2 (ZPA-2), correspondente ao Parque Estadual das Dunas de Natal "Jornalista Luiz Maria Alves" (PEDN). As coletas foram realizadas nas áreas de uso público e nas trilhas Perobinha, Peroba e Ubaia-Doce no período de fevereiro de 2025 a agosto de 2026.

COLETA DOS FRUTOS E REGISTRO DAS COORDENADAS

Foram coletados frutos maduros ou com sinais de infestação caídos no substrato abaixo das plantas hospedeiras, bem como os aderidos a elas. No momento da coleta, cada amostra foi fotografada utilizando o aplicativo Timestamp Camera (v. 1.252), que permitiu registrar os dados de localização juntamente à imagem do fruto. As coordenadas geográficas foram registradas no sistema de latitude e longitude em graus decimais, posteriormente utilizadas para identificar o ponto de coleta e organizadas na planilha de registro.

ACONDICIONAMENTO DOS FRUTOS E OBTENÇÃO DAS FORMAS IMATURAS

Após o transporte ao laboratório, os frutos foram pesados e acondicionados em recipientes plásticos contendo vermiculita previamente umedecida, utilizada como substrato para a pupação das larvas conforme metodologia adaptada de Nascimento et al. (2000). Cada recipiente foi identificado com informações referentes à localidade, data de coleta e planta hospedeira. Os recipientes foram cobertos com tecido voil e mantidos presos por elásticos, permitindo a ventilação e evitando a fuga dos insetos. As amostras permaneceram em condições naturais de temperatura e umidade. Semanalmente, durante três semanas, a vermiculita era peneirada para a recuperação das formas imaturas. O material retido, constituído por resíduos, larvas e pupas associadas a pequena quantidade de substrato, era transferido para recipientes plásticos, como garrafas pet cortadas, e posteriormente acondicionado em gaiolas de acrílico, destinadas à emergência dos adultos.
Após três peneiradas, os frutos eram descartados e o conteúdo das gaiolas de acrílico era mantido por mais sete dias para que ocorresse a emergência dos adultos. Após esse período, a vermiculita utilizada era autoclavada a 1 atm e 120 °C durante 20 minutos, com a finalidade de reduzir o risco de contaminação entre as amostras e possibilitar sua reutilização.

EMERGÊNCIA E PRESERVAÇÃO DOS INSETOS

Após a emergência, os insetos foram retirados e separados conforme o grupo taxonômico e a amostra de origem. Os adultos destinados à identificação foram eutanasiados por resfriamento e preservados em álcool etílico a 70%, em recipientes devidamente identificados com os dados de procedência.

TRIAGEM, CONTAGEM E SEXAGEM

Os exemplares de Tephritidae foram submetidos à triagem e contagem individual com auxílio de estereomicroscópio, utilizando placas de Petri para facilitar a separação e organização dos espécimes. A sexagem foi realizada pela observação do ovipositor, sendo classificados como fêmeas os indivíduos que apresentavam essa estrutura e como machos aqueles em que ela estava ausente.

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A identificação das moscas das frutas foi realizada sob estereomicroscópio, utilizando a chave pictórica de Basílio (2025) para as espécies de Anastrepha com ocorrência no Rio Grande do Norte e, posteriormente, a obra de Zucchi et al. (2023) para comparação e confirmação dos caracteres em nível nacional. Foram considerados caracteres

morfológicos externos, com ênfase no padrão das asas e na morfologia do acúleo das fêmeas. Para análise do acúleo, a estrutura foi cuidadosamente retirada, posicionada em lâmina de microscopia e recoberta com glicerina; em seguida, foi colocada uma lamínula sobre a preparação para observação em microscópio óptico.
Os parasitoides emergidos foram separados dos tefritídeos e identificados com base nos caracteres morfológicos e na chave taxonômica apresentada por Marinho (2004), considerando principalmente características da cabeça, tórax, asas, propódeo e metassoma. Os exemplares foram registrados conforme a amostra de origem, mantendo sua associação com os tefritídeos e as respectivas plantas hospedeiras.

REGISTRO E ORGANIZAÇÃO DOS DADOS

Os dados obtidos em campo e no laboratório foram inseridos em uma planilha eletrônica padronizada criada no Google Planilhas, permitindo acompanhar cada amostra desde sua coleta até a identificação dos organismos. Foram registrados ponto de coleta, latitude e longitude, data, planta e fruto hospedeiro, quantidade e massa dos frutos, número de adultos emergidos, espécie de Tephritidae, sexo dos indivíduos e ocorrência e identificação de parasitoides. A organização seguiu campos padronizados para localidade, coordenadas, data, hospedeiro, quantidade de indivíduos, taxonomia e sexagem, possibilitando a rastreabilidade dos procedimentos e a posterior consolidação dos dados.

Resultados e Discussões

Ao longo do período de amostragem (fevereiro de 2025 a agosto de 2026), foram coletadas amostras de frutos de 30 espécies de plantas hospedeiras, distribuídas em 18 famílias botânicas, na Zona de Proteção Ambiental 2 (ZPA-2). Destas, 15 espécies, pertencentes a 7 famílias botânicas, resultaram efetivamente na emergência de adultos de Tephritidae e/ou de parasitoides (Tabela 1), com destaque para a família Myrtaceae Juss., que apresentou a maior riqueza de hospedeiros com emergência, com sete espécies *(Campomanesia dichotoma, Campomanesia ilhoensis, Eugenia aff. punicifolia, Eugenia astringens, Eugenia azeda, Eugenia ligustrina* e *Myrciaria cuspidata*), seguida por Sapotaceae Juss. e Malpighiaceae Juss., com duas espécies cada, e Anacardiaceae R.Br., Chrysobalanaceae R.Br., Lamiaceae Martinov e Simaroubaceae DC., com uma espécie cada.

No total, emergiram 658 adultos de Tephritidae, sendo 293 fêmeas e 365 machos (razão sexual de aproximadamente 0,45 fêmea:macho), pertencentes a seis espécies: *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), *Anastrepha obliqua* (Macquart), *Anastrepha serpentina* (Wiedemann), *Anastrepha sororcula* Zucchi, *Anastrepha macrura* Hendel e *Ceratitis capitata* (Wiedemann). *Anastrepha serpentina* foi a espécie mais abundante em número absoluto de indivíduos (221 adultos), obtida exclusivamente de frutos de *Manilkara salzmannii*, seguida por *A. fraterculus* (220 indivíduos, associada a nove das quinze plantas hospedeiras registradas) e *A. obliqua* (153 indivíduos). *Ceratitis capitata*, espécie exótica, esteve associada a nove plantas hospedeiras nativas, totalizando 61

adultos emergidos, enquanto *A. sororcula* e *A. macrura* apresentaram os menores registros de abundância, com um e dois indivíduos, respectivamente.

Entre os hospedeiros amostrados, destacam-se novos registros de associação, com destaque para *Pradosia restingae* como hospedeira de *A. macrura, Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth como hospedeira de *A. sororcula* e *Manilkara salzmannii* como hospedeira simultânea de três espécies de *Anastrepha* (*A. fraterculus*, *A. obliqua* e *A. serpentina*), além de *C. capitata*.

Quanto ao parasitismo, foram recuperados 22 exemplares de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae), pertencentes a duas espécies: *Doryctobracon areolatus* (Szepligeti) (14 indivíduos; 8 fêmeas e 6 machos) e *Opius bellus* Gahan (8 indivíduos; 3 fêmeas e 5 machos). *Doryctobracon areolatus* foi registrado associado a sete espécies de plantas hospedeiras, enquanto *Opius bellus* esteve associado a quatro espécies. Não foi observado parasitismo nas amostras associadas a *Byrsonima crassifolia*, *Malpighia emarginata* DC., *Eugenia* aff. *punicifolia*, *Eugenia astringens* Cambess., *Pradosia restingae* e *Homalolepis bahiensis* (Moric.) Devecchi & Pirani.

As demais 15 espécies de plantas hospedeiras amostradas, pertencentes a 11 famílias adicionais, tiveram frutos coletados e processados em laboratório, porém não apresentaram emergência de Tephritidae ou de parasitoides no período avaliado: em Arecaceae Bercht. & J.Presl, *Syagrus cearensis* Noblick (Catolé); em Sapotaceae, *Pouteria bangii* (Rusby) T.D.Penn. (Abiurana) e *Lucuma grandiflora* A.DC. (Bapeba-da-restinga); em Rhamnaceae Juss., *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.) Hauenschild (Juá); em Opiliaceae Valeton, *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook.f. (Cervejinha); em Euphorbiaceae Juss., *Manihot dichotoma* Ule (Maniçoba); em Lauraceae Juss., *Mespilodaphne fasciculata* (Nees) Trofimov (Louro-de-cheiro); em Polygonaceae Juss., *Coccoloba alnifolia* Casar. (Uvinha-da-restinga); em Malvaceae Juss., *Pachira endecaphylla* (Vell.) Carv.-Sobr. (Castanha-do-maranhão); em Apocynaceae Juss., *Hancornia speciosa* Gomes (Mangaba); em Passifloraceae Juss. ex Roussel, *Passiflora subrotunda* Mast. (Maracujá-da-praia); em Rubiaceae Juss., *Tocoyena sellowiana* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Jenipapinho); em Chrysobalanaceae, *Hirtella racemosa* Lam. (Ajirú-do-mato); em Erythroxylaceae Kunth, *Erythroxylum passerinum* Mart. (Bom-nome); e em Myrtaceae, *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC., registrada separadamente de *E.* aff. *punicifolia*. *Sarcomphalus joazeiro, Syagrus cearensis, Manihot dichotoma, Lucuma grandiflora* e *Coccoloba alnifolia* foram os hospedeiros mais amostrados sem emergência (14, 12, 11, 11 e 6 registros de coleta, respectivamente), sugerindo tratar-se de recursos frutíferos abundantes na área, porém não explorados pelas espécies de tefritídeos monitoradas, ao menos no período e nas condições avaliadas.

DISCUSSÃO

INEDITISMO E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA TEPHRITOFAUNA URBANA

O presente estudo representa um dos primeiros levantamentos sistemáticos e de longa duração (fevereiro de 2025 a agosto de 2026) da associação entre Tephritidae Newman, 1834, seus parasitoides e plantas hospedeiras nativas em uma unidade de conservação urbana no Rio Grande do Norte. Enquanto a maior parte da literatura regional sobre

moscas-das-frutas concentra-se em sistemas agrícolas ou em áreas de caatinga do semiárido potiguar (ARAÚJO; MEDEIROS; SILVA; ZUCCHI, 2005), o presente trabalho desloca o foco para um fragmento de vegetação natural de dunas e tabuleiro litorâneo inserido na malha urbana de Natal. Essa mudança de escala ecológica é relevante porque fragmentos urbanos de vegetação nativa funcionam simultaneamente como reservatórios de biodiversidade e como possíveis fontes ou sumidouros de espécies-praga para pomares e cultivos comerciais no entorno, o que reforça a importância estratégica da ZPA-2 tanto para a conservação quanto para a fitossanidade regional, sobretudo diante do status de Área Livre de Praga para *Anastrepha grandis* (Macquart, 1846) que favorece a exportação de cucurbitáceas (Cucurbitaceae Juss.) no estado (ARAÚJO; FERNANDES, 2021).

A amplitude amostral, 30 espécies de plantas hospedeiras potenciais distribuídas em 18 famílias botânicas, com emergência efetiva de tefritídeos e/ou parasitoides em 15 espécies de 7 famílias, também confere ineditismo ao levantamento, uma vez que amplia consideravelmente o número de associações planta-hospedeira-parasitoide documentadas para espécies nativas de Myrtaceae Juss., Sapotaceae Juss. e Malpighiaceae Juss. na região, grupos historicamente subamostrados quando comparados a hospedeiros cultivados como manga (*Mangifera indica* L. [Anacardiaceae R.Br.]) e goiaba (*Psidium guajava* L. [Myrtaceae Juss.]).

COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS REGIONAIS E NACIONAIS

Os resultados aqui obtidos dialogam diretamente com o panorama traçado por Araújo e Fernandes (2023) para o Rio Grande do Norte, mas acrescentam um recorte inédito de ambiente natural protegido. A dominância de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), associadas a múltiplos hospedeiros, é consistente com o padrão de generalismo já relatado para essas espécies em outras localidades neotropicais (ALUJA; MANGAN, 2008). Por outro lado, a forte associação exclusiva de *Anastrepha serpentina* (Wiedemann, 1830) com *Manilkara salzmannii* (A.DC.) H.J.Lam, responsável por 221 dos 658 adultos emergidos, reforça o caráter mais especialista dessa espécie em relação a Sapotaceae Juss., padrão também observado em outras regiões do país e que aqui ganha um novo registro de hospedeiro nativo de restinga.

A presença de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) associada a nove espécies de plantas nativas é um resultado que merece destaque comparativo: em áreas agrícolas, essa espécie exótica costuma ser associada principalmente a frutíferas cultivadas (café, citros, goiaba). Seu uso recorrente de hospedeiros silvestres na ZPA-2 sugere que fragmentos urbanos de vegetação nativa podem atuar como refúgio e fonte de manutenção populacional da praga exótica ao longo do ano, mesmo fora dos períodos de safra comercial, um aspecto pouco explorado na literatura nacional sobre *C. capitata* em unidades de conservação urbanas.

Quanto ao parasitismo, a taxa observada (22 parasitoides [Braconidae Nees, 1811] para 658 tefritídeos, aproximadamente 3,3%) é baixa quando comparada aos percentuais de parasitismo natural relatados por Marinho (2004) para o estado de São Paulo, onde populações de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) podem atingir índices bem superiores em pomares e fragmentos florestais. Essa diferença pode refletir tanto peculiaridades do ambiente de dunas e restinga quanto o efeito de fragmentação urbana

sobre a comunidade de inimigos naturais, hipótese que carece de investigação direcionada.

LACUNAS PREENCHIDAS E NOVOS REGISTROS DE HOSPEDEIROS

O estudo preenche lacunas apontadas por Basílio (2026) quanto à escassez de dados sobre plantas nativas hospedeiras de tefritídeos em Zonas de Proteção Ambiental urbanas do Rio Grande do Norte. Os três novos registros de associação, *Pradosia restingae* T.D.Penn. como hospedeira de *Anastrepha macrura* Hendel, 1914, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth como hospedeira de *Anastrepha sororcula* Zucchi, 1979, e *Manilkara salzmannii* como hospedeira simultânea de três espécies de *Anastrepha* Schiner, 1868 e de C. capitata — ampliam o conhecimento sobre o espectro de hospedeiros nativos dessas espécies, até então documentado de forma incipiente na literatura regional.

Ao mesmo tempo, a listagem das 15 espécies de plantas amostradas sem qualquer emergência de tefritídeos ou parasitoides, muitas delas com número expressivo de coletas (como *Sarcomphalus joazeiro* (Mart.) Hauenschild [Rhamnaceae Juss.] e *Syagrus cearensis* Noblick [Arecaceae Bercht. & J.Presl]), constitui um dado negativo relevante: ainda que não comprove ausência definitiva de uso como hospedeiro, indica que esses recursos frutíferos abundantes não estão sendo explorados pelas espécies monitoradas nas condições avaliadas, contribuindo para delimitar melhor o espectro real de hospedeiros nativos na área.

LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS E SUGESTÕES DE APRIMORAMENTO

Algumas limitações metodológicas do estudo merecem ser discutidas criticamente:

Primeiro, o desenho amostral não padronizou o esforço de coleta por espécie hospedeira: a massa de frutos processada variou de aproximadamente 48,5 g (*Byrsonima crassifolia*) a mais de 3000 g (*Eugenia azeda* Sobral [Myrtaceae Juss.]), o que compromete comparações diretas de abundância entre hospedeiros e pode subestimar a real riqueza de tefritídeos associados a espécies com baixo volume amostrado, como *A. sororcula* e *A. macrura*, registradas com apenas um e dois indivíduos, respectivamente. O cálculo de índices de infestação (número de pupários ou adultos por quilograma de fruto), amplamente utilizado na literatura de tefritídeos, não foi apresentado, embora os dados de massa coletados permitissem essa análise; sua inclusão em trabalhos futuros tornaria os resultados mais comparáveis entre hospedeiros e entre estudos.

Segundo, o método empregado (coleta de frutos e obtenção de adultos por criação em vermiculita) captura apenas a fração da população efetivamente associada à frutificação disponível no momento da amostragem, sem informação complementar sobre a dinâmica populacional adulta ao longo do tempo. A ausência de armadilhas tipo McPhail ou similares, tradicionalmente usadas em monitoramento de tefritídeos, limita a detecção de espécies com baixa frequência nos hospedeiros amostrados ou não associadas às plantas selecionadas, além de não permitir estimar flutuação populacional sazonal de adultos independente da frutificação.

Terceiro, a identificação taxonômica de tefritídeos e parasitoides baseou-se exclusivamente em caracteres morfológicos, sem confirmação molecular. Embora as chaves utilizadas (BASÍLIO, 2025; ZUCCHI et al., 2023; MARINHO, 2004) sejam referências consolidadas, a incorporação de códigos de barras de DNA (DNA barcoding), sobretudo para espécies morfologicamente próximas do complexo fraterculus, agregaria robustez às identificações e possibilitaria a detecção de possíveis espécies crípticas.

Quarto, apesar do período amostral relativamente longo (aproximadamente dezoito meses), os resultados foram apresentados de forma agregada, sem análise sazonal explícita da emergência de tefritídeos e parasitoides em relação à fenologia dos hospedeiros ou a variáveis climáticas (pluviosidade, temperatura). Uma análise temporal mais refinada poderia revelar padrões de sincronia entre frutificação, oviposição e parasitismo, hoje ocultos na apresentação consolidada dos dados.

Por fim, a restrição das coletas às áreas de uso público e às trilhas Perobinha, Peroba e Ubaia-Doce, embora justificável operacionalmente, pode não representar toda a heterogeneidade ambiental da ZPA-2. A ampliação do número e da distribuição espacial dos pontos amostrais, idealmente com um desenho de amostragem sistemática ou estratificada por fitofisionomia, aumentaria a representatividade espacial dos resultados. A ausência de tratamento estatístico formal (curvas de acumulação de espécies, estimadores de riqueza, índices de diversidade como Shannon-Wiener) também limita a robustez das conclusões sobre completude do inventário; a aplicação desses métodos em análises futuras permitiria avaliar se o esforço amostral foi suficiente para capturar a real diversidade de tefritídeos e parasitoides da área.

LACUNAS AINDA ABERTAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos abrem novas questões que extrapolam o escopo deste trabalho. A baixa taxa de parasitismo observada levanta a pergunta sobre quais fatores limitam a ação de *Doryctobracon areolatus* e *Opius bellus* Gahan, 1930 na ZPA-2, disponibilidade de hospedeiros alternativos, efeitos de borda urbana, ou simplesmente subamostragem dos parasitoides, sendo necessário investigar com desenho amostral específico voltado ao controle biológico natural. Da mesma forma, permanece em aberto se as 15 espécies de plantas sem emergência registrada são de fato não hospedeiras, ou se a ausência de registros decorre de dessincronia entre o período de coleta e o pico de frutificação, apontando para a necessidade de um monitoramento fenológico mais fino dos hospedeiros nativos.

Outra lacuna relevante diz respeito à função da ZPA-2 na dinâmica populacional de *Ceratitis capitata* em escala de paisagem urbana: seria importante investigar em que medida o fragmento funciona como fonte de reinfestação para áreas agrícolas adjacentes, informação de valor direto para o manejo fitossanitário e para a manutenção do status de Área Livre de Praga na região. Por fim, a ampliação do estudo para outras Zonas de Proteção Ambiental de Natal permitiria avaliar se os padrões aqui descritos são particulares à ZPA-2 ou representativos do conjunto de remanescentes de vegetação natural inseridos na matriz urbana da cidade, fortalecendo o uso desses dados como subsídio para políticas de monitoramento e conservação da biodiversidade.

Conclusão

O levantamento realizado na Zona de Proteção Ambiental 2 (ZPA-2) permitiu caracterizar a comunidade de Tephritidae e seus parasitoides Braconidae em um ecossistema de dunas e tabuleiro litorâneo inserido na matriz urbana de Natal, preenchendo lacunas de conhecimento sobre espécies e hospedeiros em vegetação nativa protegida.

Os dados obtidos confirmam a presença de seis espécies de moscas-das-frutas (*Anastrepha fraterculus, A. obliqua, A. serpentina, A. sororcula, A. macrura* e a exótica *Ceratitis capitata*), revelando novos registros de interações tróficas para a região, como a utilização de *Pradosia restingae* por *A. macrura*, de *Byrsonima crassifolia* por *A. sororcula* e a múltipla infestação de *Manilkara salzmannii*. A utilização recorrente de frutos nativos pela espécie exótica *C. capitata* evidencia que a ZPA-2 atua como reservatório urbano e refúgio natural para populações desse inseto ao longo do ano.

A recuperação de parasitoides nativos (*Doryctobracon areolatus* e *Opius bellus*) demonstra a ocorrência de controle biológico natural na área, embora a taxa de parasitismo observada tenha sido baixa (3,3%). O registro de 15 espécies botânicas sem emergência de tefritídeos delimita o espectro de hospedeiros efetivamente explorados na área sob as condições do estudo.

Em suma, os resultados destacam a relevância da ZPA-2 tanto para a conservação da biodiversidade da entomofauna regional quanto para o monitoramento fitossanitário do estado do Rio Grande do Norte. Recomenda-se que pesquisas futuras incorporem amostragens pareadas com armadilhas para adultos, padronização do esforço amostral (com cálculo de índices de infestação), análise da dinâmica temporal/sazonal associada à fenologia das plantas e ferramentas de identificação molecular, permitindo aprofundar a compreensão das redes tróficas nesses fragmentos urbanos.

Referências

ALUJA, M.; MANGAN, R. L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities, and opportunities. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 53, p. 311–335, 2008.

ARAÚJO, E. L.; FERNANDES, E. C. A cultura do meloeiro e a manutenção do status de Área Livre da Mosca-do-Meloeiro *(Anastrepha grandis*) no Rio Grande do Norte. Mossoró: Editora UERN, 2021.

ARAÚJO, E. L.; FERNANDES, E. C. Moscas-das-frutas, suas plantas hospedeiras e parasitoides no estado do Rio Grande do Norte. In: ZUCCHI, R. A.; MALAVASI, A.; ADAIME, R.; NAVA, D. E. (org.). Moscas-das-frutas no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Piracicaba: FEALQ, 2023. v. 2, p. 289–298.

ARAÚJO, E. L.; MEDEIROS, M. K. M.; SILVA, V. E.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Semi-Árido do Rio Grande do Norte: plantas hospedeiras e índices de infestação. Neotropical Entomology, Londrina, v. 34, n. 6, p. 889–894, 2005.

ARAÚJO, E. L.; ZUCCHI, R. A.; CANAL, N. A. Caracterização e ocorrência de *Anastrepha zenildae* Zucchi (Diptera: Tephritidae) e seus parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) numa nova planta hospedeira, no Rio Grande do Norte. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, v. 25, n. 1, p. 147–150, 1996.

BASÍLIO, J. V. N. Chave pictórica ilustrada para identificação de fêmeas de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) com ocorrência no Rio Grande do Norte, Brasil. Zenodo, 2025. Disponível em:https://doi.org/10.5281/zenodo.18056828. Acesso em: 11 ago. 2026.

BASÍLIO, J. V. N. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Rio Grande do Norte: diversidade, aspectos ecológicos e morfometria. 2026. 203 f. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2026.

MARINHO, C. F. Espécies de parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Estado de São Paulo: caracterização taxonômica, distribuição geográfica e percentagem de parasitismo. 2004. 88 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. S.; MALAVASI, A. Monitoramento de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 109–112.

NATAL. Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Urbanismo. Zoneamento ambiental de Natal. Natal: SEMURB, 2008.

OLIVEIRA, C. M. et al. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. Journal of Applied Entomology, Berlin, v. 137, n. 1-2, p. 1–15, 2013.

RIO GRANDE DO NORTE. Decreto nº 13.500, de 5 de setembro de 1977. Aprova o Regulamento dos Parques Estaduais. Natal: Governo do Estado do Rio Grande do Norte, 1977.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 13–24.

ZUCCHI, R. A.; MALAVASI, A. Prejuízos das moscas-das-frutas na exportação de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado. Anais [...]. Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p. 73–77.

ZUCCHI, R. A. et al. Chave de identificação interativa para espécies de Anastrepha e Ceratitis (Diptera: Tephritidae) do Brasil. Piracicaba: ESALQ/USP, 2023.

Anexos



Tabela 1 – Relação de plantas hospedeiras, espécies de moscas-da-fruta e parasitoides associados, com a respectiva abundância de adultos emergidos e peso amostral no Parque das Dunas de Natal, de agosto de 2025 a setembro de 2026.

CÓDIGO: SB1636

AUTOR: ANA JULIA TAVARES DA SILVA

ORIENTADOR: RAIMUNDO FERNANDES DE ARAUJO JUNIOR

TÍTULO: Bloqueio da metástase do câncer colorretal por modulação de M2-TAM, ultilizando nanovacinas contendo antígeno tumoral, TLR e siRNA associadas a nanopartículas de quitosina carreadas com oxaliplatina.

Resumo

O câncer colorretal (CCR) metastático apresenta elevada complexidade devido à disseminação tumoral e à interação com o microambiente tumoral, destacando-se os macrófagos associados ao tumor (TAMs), especialmente o perfil M2. Este projeto avaliou estratégias terapêuticas baseadas em nanopartículas para modulação imunológica e tratamento do CCR com disseminação peritoneal. Foram utilizadas células CT26 em camundongos Balb/c, distribuídos nos grupos Salina, MIX e NP ESTR. COMPLETA. O grupo MIX recebeu TLR116 e ácido hialurônico nos linfonodos, enquanto o grupo NP ESTR. COMPLETA recebeu NanoP Mix nos linfonodos associada a Nano OXA e Nano RNA-si por via intraperitoneal. Foram avaliados peso corporal, parâmetros hematológicos e marcadores bioquímicos hepáticos e renais. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e Salina quanto ao peso e aos parâmetros bioquímicos. Na avaliação hematológica, ocorreram alterações pontuais, incluindo diferença na contagem de basófilos. De modo geral, os tratamentos não promoveram alterações sistêmicas significativas nas condições avaliadas. O estudo segue em andamento, com análises histopatológicas e moleculares previstas.

Palavras-chave: Câncer colorretal; metástase peritoneal; nanopartículas; oxaliplatina.

TITLE: Blockade of Colorectal Cancer Metastasis by M2-TAM Modulation Using Nanovaccines Containing Tumor Antigen, TLR, and siRNA Associated with Oxaliplatin-Loaded Chitosan Nanoparticles

Abstract

Metastatic colorectal cancer (CRC) is characterized by tumor dissemination and interactions with the tumor microenvironment. This study evaluated the systemic effects of therapeutic strategies for CRC with peritoneal dissemination in a murine

model. CT26 cells were used in animals assigned to Saline, MIX, and COMPLETE NP ESTR. groups. The MIX group received TLR116 and hyaluronic acid in the lymph nodes, while the COMPLETE NP ESTR. group received NanoP Mix in the lymph nodes combined with Nano OXA and Nano siRNA for intraperitoneal tumor treatment. Body weight, hematological parameters, and hepatic and renal biochemical markers were evaluated. No significant differences were observed between treated and Saline groups in body weight or the main biochemical parameters. Hematological analysis showed isolated changes, including a difference in basophil counts between the COMPLETE NP ESTR. and Saline groups. Overall, the treatments did not induce significant systemic alterations under the conditions evaluated. The study is ongoing, with histopathological and molecular analyses planned to further assess tumor progression, toxicity, and the tumor microenvironment.

Keywords: Colorectal cancer; peritoneal metastasis; nanoparticles; oxaliplatin.

Introdução

O câncer constitui um importante desafio à saúde pública mundial devido à elevada incidência, morbidade e mortalidade, sendo caracterizado pelo crescimento descontrolado de células alteradas, capazes de invadir tecidos e disseminar-se por metástase (Brown et al., 2023). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, muitos pacientes são diagnosticados em estágios avançados, associados à maior disseminação tumoral, necessidade de tratamentos mais agressivos, pior prognóstico, menor sobrevida e impacto na qualidade de vida (Chung et al., 2024; Siegel et al., 2024).

Entre as neoplasias, o câncer colorretal (CCR) destaca-se pela elevada incidência e mortalidade mundial (Xi; Xu, 2021). A doença acomete cólon e reto e envolve fatores genéticos e ambientais, como envelhecimento, alimentação inadequada, sedentarismo, obesidade, tabagismo e consumo excessivo de álcool (Sninsky et al., 2022). Sua progressão pode ocorrer por vias linfática, hematogênica e peritoneal, sendo fígado e pulmões importantes sítios metastáticos. A carcinomatose peritoneal é uma manifestação agressiva, associada a pior prognóstico e menor sobrevida, enquanto os linfonodos participam da drenagem tumoral e da resposta imunológica (Lenos et al., 2022; Fujimoto; Dieterich, 2021).

A progressão tumoral envolve a interação entre células neoplásicas e o microambiente tumoral, destacando-se os macrófagos associados ao tumor (TAMs), que apresentam plasticidade e características semelhantes aos perfis M1 ou M2. Enquanto M1 está associado a respostas pró-inflamatórias e antitumorais, M2 apresenta características imunossupressoras e pode favorecer a progressão e metástase, tornando sua modulação uma possível estratégia terapêutica (Zhang et al., 2024).

Nesse contexto, sistemas nanoparticulados podem melhorar a entrega de agentes terapêuticos, promovendo estabilidade, liberação controlada e distribuição direcionada (Buyana et al., 2022). Entre as opções terapêuticas, destaca-se a oxaliplatina (OXA), quimioterápico à base de platina que forma ligações cruzadas com o DNA,

comprometendo sua replicação e reparo e favorecendo a morte celular (O'Dowd et al., 2023). Entretanto, seus efeitos adversos e o desenvolvimento de resistência podem limitar sua eficácia (Buyana et al., 2022). A Nano Oxa utilizada neste estudo contém quitosana, empregada por sua biocompatibilidade, e ácido fólico, como estratégia de direcionamento às células que expressam receptores de folato, favorecendo a entrega da OXA às células tumorais (Buyana et al., 2022; Ragelle et al., 2019).

Outra estratégia é o silenciamento gênico por RNA de interferência (siRNA), capaz de interferir na expressão de genes relacionados à progressão tumoral e à resistência terapêutica. O uso de nanopartículas pode proteger o siRNA da degradação e favorecer sua entrega às células-alvo (Zhou et al., 2022). Dessa forma, a associação da Nano RNA-si à Nano Oxa permite combinar a ação quimioterápica à modulação de mecanismos moleculares relacionados à progressão e resistência tumoral.

A modulação imunológica também pode interferir no microambiente tumoral (Li et al., 2024). Os agonistas de TLR podem estimular células imunológicas e modificar a resposta inflamatória, enquanto o ácido hialurônico, por sua biocompatibilidade e interação com receptores como CD44, pode contribuir para o direcionamento e a liberação de nanopartículas (Li et al., 2024). Neste estudo, a Nano P Mix, contendo agonista de TLR e ácido hialurônico, foi administrada nos linfonodos, buscando favorecer a modulação da resposta imunológica. O grupo Salina recebeu PBS; o grupo MIX recebeu TLR116 e ácido hialurônico; e o grupo NP ESTR. COMPLETA recebeu NanoP Mix nos linfonodos associada à Nano OXA e Nano RNA-si por via intraperitoneal. Dessa forma, buscou-se avaliar a modulação imunológica isolada e sua associação ao tratamento tumoral, considerando seus efeitos sobre a progressão do CCR e o microambiente tumoral.

Metodologia

Ensaio *in vitro*

Para a realização do modelo experimental, foi utilizada a linhagem celular CT26, correspondente a células de carcinoma de cólon murino , obtida da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas em condições estéreis, em garrafas de cultivo, mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO_2. O cultivo foi realizado em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) + 1% de Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, Cat. n.o P0781-100ML, EUA) + 0,1% de Anfotericina B (Capricorn Scientific, Cat. n.o AMP-B, Alemanha). As células foram lavadas com PBS 1× e, conforme a necessidade de expansão, submetidas à tripsina para desprendimento da superfície da garrafa. Após aproximadamente cinco minutos, a ação da enzima foi neutralizada com DMEM suplementado com SFB. Em seguida, as células foram centrifugadas, contadas e novamente cultivadas até a obtenção da quantidade necessária para a inoculação dos animais. Ao final, as células foram ressuspendidas em 100 uL de PBS e

colocadas em seringa estéril para serem inoculadas em cada camundongo, sendo utilizadas 1 × 10⁶ células por animal.

Ensaio *in vivo*

Foram utilizados 24 camundongos machos da linhagem Balb/c, distribuídos em três grupos experimentais, com oito animais por grupo. Os animais apresentavam aproximadamente 5–6 semanas de idade e peso inicial entre 28 e 30 g, sendo mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal em Farmacologia da Inflamação e Investigação do Câncer (LAFINC), sob temperatura de 22 ± 1 °C, umidade aproximada de 70%, com acesso à água e ração e ciclo claro-escuro de 12 horas.

O modelo experimental teve duração de 15 dias e foi estabelecido por meio da inoculação intraperitoneal de células CT26, conforme metodologia descrita por De Carvalho et al. (2023). Nos dias 14 e 7 antes da inoculação, foram realizados os tratamentos nos linfonodos inguinais direito e esquerdo. O grupo salina recebeu PBS bilateralmente, enquanto o grupo MIX recebeu a formulação contendo TLR116 e ácido hialurônico, sendo administrados 50 µL em cada linfonodo. O grupo NP ESTR. COMPLETA recebeu a formulação Nano MIX bilateralmente nos linfonodos, associada às nanopartículas Nano OXA (2 mg/kg) e Nano RNA si (0,05 mg/kg) para o tratamento tumoral na cavidade peritoneal.

No dia zero, foi realizada a inoculação intraperitoneal de 1 × 10⁶ células CT26/ 100 microlitros, no quadrante inferior esquerdo. Antes da inoculação, os animais foram anestesiados com xilazina (20 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). No No dia cinco, foi realizado o tratamento intraperitoneal, sendo administrado PBS aos grupos Salina e MIX, enquanto o grupo NP ESTR. COMPLETA recebeu NanoOxa associada ao NanoRNA-si.

Monitoramento ponderal e avaliação dos nichos metastáticos

Durante o período experimental, os animais foram pesados periodicamente para acompanhamento da evolução do peso. Ao final dos 15 dias, foi realizada a eutanásia dos animais, seguida da avaliação da cavidade peritoneal, para identificação, contagem e pesagem dos nichos metastáticos, foi avaliado toda a cavidade peritonial do animal. A avaliação foi realizada com o objetivo de comparar a disseminação tumoral entre os diferentes grupos experimentais. Posteriormente, foram coletadas amostrasde sangue por punção intracardíaca,para as análises hematológicas e bioquímicas e retirados fígado, baço, pulmão, linfonodos e intestino para análises posteriores.

Análises hematológicas e bioquímicas

Coleta sanguínea por punção intracardíaca

Para a coleta sanguínea, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (20 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), seguindo os parâmetros éticos estabelecidos para experimentação animal. Foi utilizada seringa estéril de 1 mL para a realização da punção intracardíaca e obtenção do

sangue total. As amostras destinadas às análises hematológicas foram acondicionadas em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), enquanto as destinadas às análises bioquímicas foram acondicionadas em tubos com ativador de coágulo.

Dosagens bioquímicas

Cerca de 500 µL de sangue total foram acondicionados em tubos com ativador de coágulo. Após a centrifugação, foi obtido o soro sanguíneo, utilizado para a análise dos marcadores hepáticos AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), e dos marcadores renais ureia e creatinina. As dosagens foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático BIO-2000 (Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda., Barueri, SP, Brasil). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Bioanálises do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Hematologia

Cerca de 250 µL de sangue total foram acondicionados em tubos contendo EDTA e utilizados para a realização do hemograma. As amostras foram analisadas em hemocitômetro automático URIT BH-70P VET (URIT Medical Electronic Co. Ltd., Guilin, China). Foram avaliados os parâmetros eritrocitários, incluindo contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, VGM (volume globular médio), HGM (hemoglobina globular média) e CHGM (concentração de hemoglobina globular média), além da contagem global e diferencial de leucócitos e do plaquetograma.

A contagem diferencial de leucócitos foi revisada por microscopia de campo claro utilizando coloração de May-Grünwald-Giemsa. Todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Farmacologia e Bioanálises do Centro de Biociências da UFRN.

Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). As comparações entre grupos foram realizadas por (ANOVA). As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-WallisValores de $p < 0,05$ foram considerados significativos($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

Resultados

Monitoramento do peso corporal

Durante o período experimental, foi realizado o acompanhamento do peso corporal dos animais dos grupos Salina, MIX e NP ESTR. COMPLETA. O grupo MIX apresentou pouca variação no peso médio entre os dias 0 e 8, mantendo-se em aproximadamente 30,0 g, com discreto aumento ao final do experimento, atingindo média de 31,6 g. O grupo NP ESTR. COMPLETA apresentou aumento progressivo do peso corporal ao longo do período experimental, alcançando aproximadamente 35,0 g ao final do experimento. O grupo Salina apresentou relativa estabilidade, com peso médio final de aproximadamente 32,5 g (Figura 1). Apesar das variações observadas nas médias de peso corporal ao longo do período experimental, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA em comparação ao grupo Salina.

Figura 1. Monitoramento de peso corporal ao longo do período experimental. Curva de evolução ponderal média (g) de camundongos, desde o período antes da inoculação das células tumorais (dia -14) até o último dia (dia 15). Os dados representam a média ± desvio padrão (DP) para os grupos Salina, MIX e NP Estrutura Completa.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A avaliação dos parâmetros bioquímicos demonstrou variações entre os grupos experimentais. Para os marcadores hepáticos, o grupo MIX apresentou os maiores valores de AST (aproximadamente 290 U/L) e ALT (80 U/L), enquanto o grupo Saudável apresentou valores de aproximadamente 150 U/L e 51 U/L, respectivamente. No grupo NP ESTR. COMPLETA, foram observados valores de aproximadamente 233 U/L para AST e 73 U/L para ALT, próximos aos observados no grupo Salina, que apresentou aproximadamente 225 U/L e 59 U/L, respectivamente (Figura 2). Apesar das variações observadas nos valores de AST e ALT entre os grupos, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados (MIX e NP ESTR. COMPLETA) e o grupo Salina. Dessa forma, as diferenças observadas nos valores dos marcadores hepáticos não apresentaram significância estatística em relação ao grupo Salina nas condições avaliadas.

Figura 2. Avaliação das concentrações séricas de biomarcadores hepáticos (A) aspartato aminotransferase (AST - U/L), (B) alanina aminotransferase (ALT - U/L).

Parâmetros renais

Em relação aos parâmetros renais, o grupo MIX apresentou valores de aproximadamente 68 mg/dL de ureia e 1,30 U/L de ácido úrico, enquanto o grupo Saudável apresentou 48 mg/dL e 1,00 U/L, respectivamente. No grupo NP ESTR. COMPLETA, foram observados aproximadamente 65 mg/dL de ureia e 0,95 U/L de ácido úrico, além de 0,14 mg/dL de creatinina, enquanto o grupo Saudável apresentou 0,17 mg/dL (Figura 3). Apesar das variações observadas entre os grupos, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os gruos tratados (MIX e NP ESTR. COMPLETA) e o grupo Salina.

Figura 3. Avaliação das concentrações séricas dos marcadores renais: (A) uréia (mg/dL), (B) creatinina (mg/dL) e (C) ácido úrico (U/L) nos grupos Saudável (Healthy), Salina, MIX e NP Complete (NP Complete). Os resultados expressam a média ± DP.

Avaliação hematológica

Na avaliação da série eritrocitária, a contagem de eritrócitos apresentou valores próximos entre os grupos MIX (8,3 × 10^6 células/μL) e NP ESTR. COMPLETA (8,2 × 10^6 células/μL), em comparação ao grupo Saudável (7,6 × 10^6 células/μL). A concentração de hemoglobina também apresentou valores semelhantes entre os grupos, sendo aproximadamente 12,9 g/dL no grupo MIX, 13,1 g/dL no grupo NP ESTR. COMPLETA e 13,1 g/dL no grupo Saudável. O hematócrito apresentou aumento significativono grupo Salina (aproximadamente 50,0%) em comparação ao grupo Saudável (36,8%; $p < 0,01$), enquanto os grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA apresentaram valores de aproximadamente 46,5% e 46,8%, respectivamente. Para o RDW, foi observada redução significativa no grupo Salina (12,4%) em relação ao grupo Saudável (15,9%; $p < 0,001$), enquanto os grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA apresentaram valores de aproximadamente 11,3% e 11,6%, respectivamente. Como podemos observar na (Figura 4).

Figura 4. Análise dos parâmetros do eritrograma (série vermelha). Determinação de (A) contagem global de eritrócitos (10^6$ células/μL), (B) concentração de hemoglobina (g/dL), (C) porcentagem de hematócrito (%) e (D) amplitude de distribuição de eritrócitos (RDW - %). Os dados representam a média ± DP. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Saudável (Healthy) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Leucograma

A contagem de leucócitos totais apresentou valores de aproximadamente 4,8 × 10^3 células/μL no grupo MIX e 4,4 × 10^3 células/μL no grupo NP ESTR. COMPLETA, em comparação a 2,8 × 10^3 células/μL no grupo Salina. A contagem absoluta de monócitos também apresentou valores superiores nos grupos MIX (0,37 × 10^3 células/μL) e NP ESTR. COMPLETA (0,33 × 10^3 células/μL), em comparação ao grupo Salina (0,075 × 10^3 células/μL). Os linfócitos reativos não foram observados no grupo Salina, enquanto foram identificados nos grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA, com aproximadamente 225 e 115 células/μL, respectivamente. A contagem de linfócitos totais foi semelhante entre os grupos NP ESTR. COMPLETA (2,25 × 10^3 células/μL) e Salina (2,2 × 10^3 células/μL).

Para os neutrófilos segmentados, o grupo NP ESTR. COMPLETA apresentou aproximadamente 1,65 × 10^3 células/μL. Os neutrófilos bastões apresentaram valores de aproximadamente 0,004 × 10^3 células/μL no grupo Salina e 0,057 × 10^3 células/μL no grupo Saudável, com diferença estatisticamente significativa entre esses grupos ($p < 0,001$). Nos grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA, não foram observados neutrófilos bastões.

As contagens de eosinófilos e basófilos permaneceram baixas ou ausentes nos grupos experimentais. Para os basófilos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo NP ESTR. COMPLETA e o grupo Salina ($p < 0,05$), com ausência dessas células no grupo NP ESTR. COMPLETA (Figura 5). Os demais parâmetros hematológicos avaliados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo Salina.

Figura 5. Avaliação quantitativa do leucograma (série branca). Perfil imunológico celular periférico representado por (A) leucócitos totais (10^3 células/µL), (B) linfócitos (10^3 células/µL), (C) linfócitos reativos (células/µL), (D) monócitos (10^3 células/µL), (E) neutrófilos bastões (10^3 células/µL), (F) neutrófilos segmentados (10^3 células/µL), (G) eosinófilos (10^3 células/µL) e (H) Basófilos (10^3 células/µL). Os dados representam a média ± DP. Asteriscos indicam significância estatística (*** $p < 0,001$ vs. Saudável; * $p < 0,05$).

Série Plaquetária

A contagem total de plaquetas apresentou maior valor no grupo Salina, com aproximadamente 1.530 × 10^3 células/µL, em comparação ao grupo Saudável, com aproximadamente 1.010 × 10^3 células/µL. Os grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA apresentaram valores de aproximadamente 1.050 × 10^3 e 1.100 × 10^3 células/µL, respectivamente.

O PDW apresentou valores entre aproximadamente 5,6% no grupo Salina e 6,5% no grupo Saudável, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados. Como podemos ver na Figura 6.

Figura 6. Perfil de resposta plaquetária periférica. Contagem de (A) plaquetas totais (10^3$ células/µL) e (B) índice de anisocitose plaquetária (PDW - %). Os resultados expressam a média ± DP.

Discussão

O monitoramento ponderal constitui um parâmetro importante para acompanhar o estado geral dos animais durante o experimento, permitindo identificar possíveis alterações associadas à progressão tumoral ou aos tratamentos(Baracos et al., 2018). No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso corporal entre os grupos tratados e o grupo Salina. Dessa forma, apesar das variações observadas ao longo do período experimental, os tratamentos não promoveram alterações significativas no peso dos animais. Esse resultado também é relevante do ponto de vista clínico, uma vez que a perda de peso é uma das principais manifestações associadas à caquexia do câncer, condição caracterizada pela perda progressiva de massa muscular, podendo também envolver redução do tecido adiposo (Talbert et al., 2014; Baracos et al., 2018). A caquexia também envolve alterações metabólicas e inflamatórias que contribuem para a perda de tecidos (Baracos et al., 2018). Assim, a ausência de redução significativa do peso corporal sugere que não houve perda ponderal importante durante o período experimental, embora a avaliação da caquexia não possa ser estabelecida exclusivamente por esse parâmetro.

Os resultados bioquímicos também devem ser interpretados considerando a análise estatística entre os grupos. Para os marcadores hepáticos, apesar das variações observadas nos valores de AST e ALT, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo Salina. Da mesma forma, para os parâmetros renais, incluindo ureia e creatinina, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo Salina. Portanto, nas condições experimentais avaliadas, os resultados não indicam alterações bioquímicas hepáticas ou renais estatisticamente associadas aos tratamentos em comparação ao grupo Salina. AST e ALT são utilizados na avaliação de alterações hepatocelulares e devem ser interpretados considerando o contexto clínico e outros parâmetros laboratoriais (Giannini et al., 2005). Da mesma forma, parâmetros como ureia e creatinina são empregados na avaliação da função renal, sendo recomendada sua interpretação em conjunto com outros parâmetros e com o contexto experimental (Kashani; Rosner; Ostermann, 2020).

A ausência de diferenças significativas nos marcadores hepáticos e renais entre os grupos tratados e o grupo Salina pode ser considerada um achado favorável quanto à tolerabilidade sistêmica das formulações nas condições avaliadas. Esse resultado pode estar relacionado, ao menos em parte, ao uso de sistemas nanoparticulados, que vêm sendo investigados como estratégias capazes de modificar a distribuição e a liberação de agentes quimioterápicos, podendo contribuir para reduzir a exposição sistêmica e os efeitos adversos associados à oxaliplatina (Mahaki et al., 2023). Entretanto, essa hipótese não pode ser confirmada apenas pelos parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo, sendo necessária a associação com outras análises de toxicidade.

Em relação à creatinina, embora o grupo NP ESTR. COMPLETA tenha apresentado concentração inferior à observada no grupo Salina, essa diferença não apresentou significância estatística. Assim, esse resultado não deve ser interpretado como evidência de melhora da função renal ou de efeito protetor da formulação. A creatinina é um importante marcador utilizado na avaliação da função renal, porém apresenta limitações quando analisada isoladamente, sendo recomendada sua interpretação em conjunto com outros parâmetros e com o contexto experimental (Kashani; Rosner; Ostermann, 2020). Da mesma forma, a manutenção das concentrações de hemoglobina e eritrócitos nos animais tratados sugere ausência de alterações relevantes nesses parâmetros da linhagem eritrocitária durante o período experimental.

Do ponto de vista imunológico, estratégias terapêuticas direcionadas ao câncer colorretal podem buscar modificar o microambiente tumoral e favorecer uma resposta antitumoral, considerando a participação de diferentes células da imunidade na progressão da doença (Jakubzick et al., 2017; Rigamonti et al., 2023). No presente estudo, os grupos tratados apresentaram valores superiores de leucócitos totais e monócitos circulantes em relação ao grupo Salina. Entretanto, como não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo Salina para esses parâmetros, essas variações não permitem afirmar que os tratamentos promoveram recrutamento ou ativação imunológica sistêmica. Os monócitos são células da imunidade inata que circulam no sangue e podem migrar para os tecidos em resposta a diferentes estímulos, onde podem adquirir características distintas e, em determinadas condições, participar da formação de macrófagos (Jakubzick et al., 2017; Rigamonti et al., 2023). No microambiente tumoral, essa migração e diferenciação são influenciadas pelos sinais presentes no tecido, podendo contribuir tanto para respostas antitumorais

quanto para processos associados à progressão tumoral (Jakubzick et al., 2017; Rigamonti et al., 2023).

A presença de linfócitos reativos nos grupos tratados, ausentes no grupo Salina, constitui um achado morfológico que pode estar relacionado à ativação linfocitária. Entretanto, esse resultado, isoladamente, não permite afirmar que ocorreu uma resposta adaptativa antitumoral, sendo necessária a associação com análises imunológicas e moleculares complementares para caracterizar esse processo.

Em relação aos neutrófilos, foi observada maior contagem de neutrófilos segmentados no grupo NP ESTR. COMPLETA, enquanto não foram observados neutrófilos bastões nos grupos tratados. A ausência de formas imaturas nos grupos MIX e NP ESTR. COMPLETA não caracteriza, por si só, um desvio à esquerda, que está relacionado à presença aumentada de formas imaturas de neutrófilos na circulação (Honda et al., 2016). O desvio à esquerda pode estar associado ao aumento da demanda e do consumo de neutrófilos, sendo utilizado como um dos parâmetros na avaliação de processos inflamatórios e infecciosos (Honda et al., 2016). Dessa forma, a ausência dessas formas imaturas nos grupos tratados não permite, isoladamente, concluir sobre a presença ou ausência de um processo inflamatório sistêmico.

As contagens de eosinófilos e basófilos permaneceram reduzidas ou ausentes nos grupos experimentais. Para os basófilos, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo NP ESTR. COMPLETA e o grupo Salina ($p < 0,05$), com ausência dessas células no grupo tratado. Embora esse resultado demonstre uma diferença entre os grupos, ele não é suficiente para concluir ausência de reações de hipersensibilidade ou estabelecer, isoladamente, a segurança imunogênica da formulação, uma vez que a avaliação dessas respostas requer a análise conjunta de outros parâmetros imunológicos e clínicos.

Em relação às plaquetas, embora o grupo Salina tenha apresentado maior contagem e os grupos tratados valores inferiores, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Dessa forma, essa variação não permite atribuir ao tratamento alterações na hemostasia ou redução da inflamação sistêmica. A contagem plaquetária pode estar relacionada a processos inflamatórios e à progressão do câncer colorretal (Väyrynen et al., 2019; Gu; Szallasi, 2017). Quanto ao PDW, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, indicando ausência de alterações detectáveis na variabilidade do tamanho das plaquetas nas condições avaliadas (Pogorzelska et al., 2020).

De maneira geral, os resultados obtidos até o momento indicam que os tratamentos avaliados não promoveram alterações estatisticamente significativas no peso corporal, nos principais parâmetros bioquímicos hepáticos e renais ou na maior parte dos parâmetros hematológicos em comparação ao grupo Salina. Esses achados sugerem um perfil de tolerabilidade sistêmica favorável das formulações nas condições experimentais avaliadas. Entretanto, o estudo encontra-se em andamento e a caracterização dos efeitos terapêuticos e dos mecanismos envolvidos ainda depende das análises complementares previstas, incluindo avaliações histopatológicas e moleculares. Essas análises poderão contribuir para uma compreensão mais abrangente dos efeitos das formulações sobre a progressão tumoral, a toxicidade e o microambiente imunológico.

Conclusão

Os resultados obtidos até o momento indicam que a formulação nanopartícula completa apresenta potencial para melhorar a tolerabilidade sistêmica do tratamento no modelo murino de câncer colorretal metastático. O maior ganho ponderal observado nesse grupo, associado à manutenção dos parâmetros eritrocitários e plaquetários, bem como aos menores níveis de AST, ALT, ureia e creatinina em comparação ao tratamento com os componentes livres, sugere uma resposta sistêmica mais favorável à formulação nanoparticulada. Junto a isso, as alterações observadas no leucograma, principalmente o aumento de monócitos, linfócitos reativos e neutrófilos segmentados, mostram que os tratamentos promoveram alterações na resposta imunológica dos animais. Entretanto, por mais que esses resultados sejam de extrema importância, somente esses achados hematológicos não permitem, isoladamente, determinar se ocorreu efetivamente uma modulação do microambiente tumoral ou dos macrófagos associados ao tumor.

Portanto, os resultados obtidos até o momento indicam um perfil sistêmico favorável da formulação nanoparticulada completa, principalmente em relação ao acompanhamento ponderal e aos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados. Entretanto, o estudo ainda se encontra em andamento, sendo necessárias análises complementares para uma avaliação mais abrangente dos efeitos da terapia. Serão realizadas as análises histopatológicas por hematoxilina-eosina (HE), imunohistoquímicas e de expressão gênica por qRT-PCR, além dos demais testes complementares previstos no protocolo. Essas análises serão fundamentais para confirmar os achados observados até o momento e determinar os efeitos da formulação sobre a disseminação metastática, o microambiente tumoral e a resposta imunológica. Dessa forma, os resultados apresentados constituem dados preliminares, que serão posteriormente integrados às análises complementares para uma conclusão definitiva sobre o potencial terapêutico da estratégia nanoparticulada.

Referências

[1] BARACOS, V. E.; MARTIN, L.; KORC, M.; GUTTRIDGE, D. C.; FEARON, K. C. H. Cancer-associated cachexia. Nature Reviews Disease Primers, v. 4, art. 17105, 2018. DOI:https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.105.

[2] BASTIAENEN, V. P.; KLAVER, C. E. L.; VAN DER HEIJDEN, M. C. S.; NIJMAN, L. E.; LECCA, M. C.; TANIS, P. J.; LENOS, K. J.; VERMEULEN, L. A mouse model for peritoneal metastases of colorectal origin recapitulates patient heterogeneity. Laboratory Investigation, v. 100, n. 11, p. 1465–1474, 2020. DOI:https://doi.org/10.1038/s41374-020-0448-x.

[3] BROWN, J. S.; AMEND, S. R.; AUSTIN, R. H.; GATENBY, R. A.; HAMMARLUND, E. U.; PIENTA, K. J. Updating the definition of cancer. Molecular Cancer Research, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023. DOI:https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411.

[4] BUYANA, B.; NAKI, T.; ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. A. Nanoparticles loaded with platinum drugs for colorectal cancer therapy. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 19, art. 11261, 2022. DOI:https://doi.org/10.3390/ijms231911261.

[5] CHUNG, K. C.; MUTHUTANTRI, A.; GOLDSMITH, G.; WATTS, M.; BROWN, A. E.; PATRICK, D. L. Symptom impact and health-related quality of life (HRQoL) assessment by cancer stage: a narrative literature review. BMC Cancer, v. 24, 2024. DOI:https://doi.org/10.1186/s12885-024-12612-z.

[6] DE CARVALHO, T. G.; LARA, P.; JORQUERA-CORDERO, C.; ARAGÃO, C. F. S.; OLIVEIRA, A. S.; GARCIA, V. B.; SOUZA, S. V. P.; SCHOMANN, T.; SOARES, L. A. L.; GUEDES, P. M. M.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F. Inhibition of murine colorectal cancer metastasis by targeting M2-TAM through STAT3/NF-kB/AKT signaling using macrophage 1-derived extracellular vesicles loaded with oxaliplatin, retinoic acid, and Libidibia ferrea. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 168, art. 115663, 2023. DOI:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115663.

[7] FUJIMOTO, N.; DIETERICH, L. C. Mechanisms and clinical significance of tumor lymphatic invasion. Cells, v. 10, n. 10, art. 2585, 2021. DOI:https://doi.org/10.3390/cells10102585.

[8] GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. CMAJ, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005. DOI:https://doi.org/10.1503/cmaj.1040752.

[9] GU, D.; SZALLASI, A. Thrombocytosis portends adverse prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of 5,619 patients in 16 individual studies. Anticancer Research, v. 37, n. 9, p. 4717–4726, 2017. DOI:https://doi.org/10.21873/anticanres.11878.

[10] HEMMI, H.; KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; SATO, S.; SANJO, H.; HOSHINO, K.; HORIUCHI, T.; TOMIZAWA, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nature Immunology, v. 3, p. 196–200, 2002. DOI:https://doi.org/10.1038/ni758.

[11] HONDA, T.; UEHARA, T.; MATSUMOTO, G.; ARAI, S.; SUGANO, M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection.

Clinica Chimica Acta, v. 457, p. 46–53, 2016. DOI:https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.03.017.

[12] HOU, S. et al. Tumor-associated macrophages in colorectal cancer metastasis: molecular insights and translational perspectives. Journal of Translational Medicine, v. 22, 2024. DOI:https://doi.org/10.1186/s12967-024-04856-x.

[13] JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. Nature Reviews Immunology, v. 17, p. 349–362, 2017. DOI:https://doi.org/10.1038/nri.2017.28.

[14] JING, H.; GAO, Y.; SUN, Z.; LI, Y.; WANG, J.; ZHANG, L.; LIU, S. Organotropic metastasis in colorectal cancer: integrating molecular pathways with therapeutic opportunities. Frontiers in Immunology, v. 16, art. 1686071, 2025. DOI:https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1686071.

[15] KASHANI, K.; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. Creatinine: from physiology to clinical application. European Journal of Internal Medicine, v. 72, p. 9–14, 2020. DOI:https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.10.025.

[16] LENOS, K. J. et al. Molecular characterization of colorectal cancer related peritoneal metastatic disease. Nature Communications, v. 13, art. 4443, 2022. DOI:https://doi.org/10.1038/s41467-022-32198-z.

[17] LI, H.; WANG, S.; YANG, Z.; MENG, X.; NIU, M. Nanomaterials modulate tumor-associated macrophages for the treatment of digestive system tumors. Bioactive Materials, v. 36, p. 376–412, 2024. DOI:https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.03.003.

[18] MAHAKI, H. et al. Nanoparticles containing oxaliplatin and the treatment of colorectal cancer. Current Pharmaceutical Design, v. 29, n. 38, p. 3018–3039, 2023. DOI:https://doi.org/10.2174/0113816128274742231103063738.

[19] O'DOWD, P. D.; SUTCLIFFE, D. F.; GRIFFITH, D. M. Oxaliplatin and its derivatives – an overview. Coordination Chemistry Reviews, v. 497, art. 215439, 2023. DOI:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215439.

[20] RAGELLE, H. et al. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. Journal of Controlled Release, v. 176, p. 54–63, 2014. DOI:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.026.

[21] RIGAMONTI, A.; VILLAR, J.; SEGURA, E. Monocyte differentiation within tissues: a renewed outlook. Trends in Immunology, v. 44, n. 12, p. 999–1013, 2023. DOI:https://doi.org/10.1016/j.it.2023.10.005.

[22] SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 74, n. 1, p. 12–49, 2024. DOI:https://doi.org/10.3322/caac.21820.

[23] SNINSKY, J. A.; SHORE, B. M.; LUPU, G. V.; CROCKETT, S. D. Risk factors for colorectal polyps and cancer. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America, v. 32, n. 2, p. 195–213, 2022. DOI:https://doi.org/10.1016/j.giec.2021.12.008.

[24] TALBERT, E. E.; METZGER, G. A.; HE, W. A.; GUTTRIDGE, D. C. Modeling human cancer cachexia in colon 26 tumor-bearing adult mice. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, v. 5, n. 4, p. 321–332, 2014. DOI:https://doi.org/10.1007/s13539-014-0141-2.

[25] TENTES, A. Fisiopatologia das metástases peritoneais colorretais. Hellenic Journal of Surgery, 2024. DOI:https://doi.org/10.59869/24032.

[26] VÄYRYNEN, J. P. et al. Platelet count, aspirin use, and characteristics of host inflammatory responses in colorectal cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, v. 38, 2019. DOI:https://doi.org/10.1186/s13046-019-1195-7.

[27] XI, Y.; XU, P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. Translational Oncology, v. 14, art. 101174, 2021. DOI:https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174.

[28] ZHOU, Y. et al. Effective delivery of siRNA-loaded nanoparticles for overcoming oxaliplatin resistance in colorectal cancer. Frontiers in Oncology, v. 12, art. 827891, 2022. DOI:https://doi.org/10.3389/fonc.2022.827891.

Anexos



Figura 1. Evolução do peso corporal dos animais dos grupos Salina, MIX e NP ESTR. COMPLETA durante o período experimental. Dados expressos em média ± DP.



Figura 2. Marcadores hepáticos: (A) AST e (B) ALT nos grupos Saudável, Salina, MIX e NP ESTR. COMPLETA. Dados expressos em média ± DP.



Figura 3. Marcadores renais: (A) ureia, (B) creatinina e (C) ácido úrico nos grupos Saudável, Salina, MIX e NP ESTR. COMPLETA. Dados expressos em média ± DP.



Figura 4. Parâmetros eritrocitários: (A) eritrócitos, (B) hemoglobina, (C) hematócrito e (D) RDW. Dados expressos em média ± DP. **p < 0,01; ***p < 0,001.



Figura 5. Leucograma: (A) leucócitos, (B) linfócitos, (C) linfócitos reativos, (D) monócitos, (E) neutrófilos bastões, (F) neutrófilos segmentados, (G) eosinófilos e (H) basófilos. Dados expressos em média ± DP. *p < 0,05; ***p < 0,001.



Figura 6. Parâmetros plaquetários: (A) plaquetas totais e (B) PDW. Dados expressos em média ± DP.

CÓDIGO: SB1639

AUTOR: RAFAEL NEVES GOMES

COAUTOR: MARIA EDUARDA FERREIRA PACHECO

COAUTOR: SANEIRIANY KESHISTON DE ARAUJO COSTA CAMARA

COAUTOR: RHAYANNE LUCENA NÓBREGA

COAUTOR: PAULINA DE FATIMA ALVES DA SILVA

COAUTOR: ALINE TAVARES MAIA

ORIENTADOR: WALLACE SILVA DO NASCIMENTO

TÍTULO: Enriquecimento auditivo como estratégia para promoção do bem-estar de juvenis de peixe-palhaço Amphiprion ocellaris em cultivo experimental

Resumo

O enriquecimento auditivo tem sido investigado como estratégia não invasiva para melhorar as condições de manutenção de peixes em cativeiro, embora seus efeitos sejam espécie-específicos. Este estudo avaliou a influência da música clássica sobre o comportamento de juvenis de Amphiprion ocellaris. Foram utilizados 18 animais distribuídos entre Controle e Música (n=9 por tratamento), com exposição a música instrumental de Antonio Vivaldi por 4 h/dia durante cinco dias consecutivos. Os vídeos foram analisados no ANY-maze® pelos testes Novel Tank Test (NTT; 360 s) e Social Preference Test (SPT; 60 s). No NTT, a Música promoveu maior permanência na zona superior, distância percorrida, velocidade e número de entradas nessa zona, além de redução significativa da imobilidade. No SPT, houve aumento significativo da distância, velocidade e frequência de entradas na zona social esquerda, sem diferença no tempo social total (SZE+SZD). A integração dos testes demonstra que o enriquecimento auditivo com Vivaldi modulou principalmente a exploração espacial e a atividade locomotora, sem evidência de aumento global da sociabilidade. Os resultados fortalecem a aplicação integrada do NTT, SPT e rastreamento automatizado como abordagem metodológica para avaliação comportamental e desenvolvimento de estratégias de bem-estar em peixes ornamentais marinhos.

Palavras-chave: aquicultura, bem-estar animal, enriquecimento auditivo, peixe-palhaço.

TITLE: Auditory enrichment as a strategy to promote welfare in juvenile clownfish Amphiprion ocellaris under experimental culture

Abstract

Auditory enrichment has been investigated as a non-invasive strategy to improve captive fish welfare, although its effects are species-specific. This study evaluated the influence of classical music on the behavior of juvenile Amphiprion ocellaris. Eighteen fish were assigned to Control and Music treatments (n=9 per treatment) and exposed to instrumental music by Antonio Vivaldi for 4 h/day over five consecutive days. Videos were analyzed using ANY-maze® through the Novel Tank Test (NTT; 360 s) and Social Preference Test (SPT; 60 s). In the NTT, Music increased time spent in the upper zone, distance travelled, swimming speed and the number of entries into this zone, while significantly reducing immobility. In the SPT, Music significantly increased total distance, swimming speed and the frequency of entries into the left social zone, with no difference in total social time (LSZ+RSZ). Integration of both tests indicates that auditory enrichment with Vivaldi primarily modulated spatial exploration and locomotor activity, without evidence of a global increase in sociability. These findings strengthen the integrated application of NTT, SPT and automated tracking as a methodological approach for behavioral assessment and the development of welfare strategies for marine ornamental fish.

Keywords: aquaculture, animal welfare, auditory enrichment, clownfish

Introdução

O bem-estar de peixes mantidos em cativeiro é uma questão crescente na aquicultura, porque alterações no ambiente de cultivo podem repercutir no comportamento, na fisiologia e no desempenho dos animais. O enriquecimento ambiental procura reduzir a monotonia do cativeiro e oferecer estímulos que permitam respostas comportamentais mais diversificadas e compatíveis com a biologia da espécie.

Entre as possibilidades de enriquecimento sensorial, o estímulo auditivo é especialmente interessante por ser não invasivo e simples de padronizar. Os efeitos, entretanto, dependem do protocolo e da espécie. Niu et al. (2025) encontraram respostas distintas conforme o instrumento e o andamento em zebrafish e guppies. Marchetto et al. (2021), por sua vez, observaram efeito comportamental da música clássica em zebrafish sem redução correspondente do cortisol. Em conjunto, esses trabalhos mostram que uma mudança de comportamento não deve ser interpretada

automaticamente como mudança fisiológica e justificam testar o estímulo diretamente na espécie de interesse.

O peixe-palhaço Amphiprion ocellaris tem importância na aquicultura ornamental marinha e vive em grupos organizados por uma hierarquia fortemente relacionada ao tamanho corporal. A comunicação acústica integra as interações sociais do gênero Amphiprion, sobretudo em contextos agonísticos e de submissão. Apesar dessa base biológica, os materiais reunidos para este projeto não identificaram estudos experimentais que tenham aplicado enriquecimento musical a A. ocellaris com avaliação conjunta de NTT, SPT e rastreamento automatizado, o que define a principal lacuna investigada neste trabalho.

A avaliação automatizada pode ampliar a objetividade dessas análises. O Novel Tank Test (NTT) permite caracterizar exploração vertical, atividade locomotora e imobilidade em ambiente novo, enquanto o Social Preference Test (SPT) permite avaliar a distribuição espacial do indivíduo diante de coespecíficos. A utilização conjunta dos testes possibilita separar componentes exploratórios, locomotores e sociais da resposta comportamental.

A bioacústica do grupo fornece uma justificativa adicional para investigar esse tipo de enriquecimento. Parmentier, Colleye e Mann (2009) demonstraram que A. ocellaris, A. frenatus e A. clarkii detectam sons entre aproximadamente 75 e 1.800 Hz e apresentam maior sensibilidade abaixo de 200 Hz. No mesmo estudo, a frequência dominante dos chamados do gênero variou com o tamanho corporal. Em uma comparação interespecífica posterior, A. ocellaris apresentou frequência dominante média de 742 ± 124 Hz (Colleye et al., 2011). Esses dados não significam que a música reproduza a comunicação natural do peixe-palhaço; eles mostram apenas que componentes de baixa frequência podem estar dentro de uma faixa biologicamente detectável pela espécie.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do enriquecimento auditivo com música clássica sobre indicadores comportamentais de juvenis de A. ocellaris, integrando NTT e SPT analisados no software ANY-maze®. A hipótese foi de que a exposição musical modificaria a exploração do ambiente e a dinâmica de aproximação social, oferecendo evidências para o desenvolvimento de estratégias de enriquecimento aplicáveis à aquicultura ornamental marinha.

Metodologia

Foram utilizados 18 juvenis de Amphiprion ocellaris, distribuídos entre dois tratamentos, Controle e Música, com nove animais por tratamento. Os peixes foram mantidos em seis aquários experimentais de 30 × 30 × 30 cm, com três animais por unidade experimental e três aquários por tratamento. A qualidade da água foi acompanhada durante o experimento, mantendo-se condições semelhantes entre os grupos, com temperatura próxima de 24 °C, salinidade entre 27 e 28 ppt e pH de 7,4 ± 0,2.

No tratamento Música foram reproduzidas, de forma padronizada, gravações de Antonio Vivaldi previamente definidas no protocolo experimental e acessadas pela plataforma YouTube (identificadores _dfRKV-CVcM e O6NRLYUThrY). Os mesmos materiais foram utilizados ao longo das sessões, durante 4 h/dia, em horário fixo, por cinco dias consecutivos. A exposição sonora foi mantida na faixa operacional registrada no experimento. Como não foi realizada hidrofonia nem análise espectral dentro dos aquários, a música foi considerada um estímulo acústico complexo e não foi atribuída ao presente ensaio uma frequência única ou uma banda subaquática medida. Essa limitação é explicitada para não confundir dados de literatura com dados produzidos neste experimento.

No Novel Tank Test (NTT), cada peixe foi acompanhado por 360 s em aquário de 30 × 30 × 30 cm. A coluna d'água foi dividida virtualmente em três faixas horizontais de 10 cm: zona superior (UZ), zona média (MZ) e zona inferior (LZ). Foram avaliados tempo de permanência nas zonas, número de entradas na UZ, distância total percorrida, velocidade média e tempo de imobilidade. Para avaliar a evolução temporal da resposta, os 360 s também foram analisados em três segmentos consecutivos de 120 s (0-120, 120-240 e 240-360 s).

No Social Preference Test (SPT), o peixe focal foi analisado durante 60 s no aquário central de um arranjo com três compartimentos. O aquário central foi dividido virtualmente em três zonas verticais de igual largura: zona social esquerda (SZE), zona neutra (NZ) e zona social direita (SZD). Três peixes-estímulo foram posicionados em cada aquário lateral. Foram extraídos tempo nas zonas, número de entradas, latência para primeira entrada, distância percorrida, velocidade, mobilidade, imobilidade e medidas complementares de aproximação. O desfecho social principal foi o tempo social total, definido como SZE+SZD, evitando interpretar uma única lateral como medida global de sociabilidade.

Para a análise estatística, os dados individuais de nove animais por tratamento foram avaliados quanto à distribuição e à homogeneidade das variâncias. Quando os pressupostos paramétricos foram adequados, utilizou-se o teste t de Welch; em distribuições fortemente não normais ou variáveis de contagem, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os valores de p foram ajustados pelo procedimento de Benjamini-Hochberg para controle da taxa de falsas descobertas (FDR) dentro das famílias de desfechos, adotando-se $q<0,05$. Os resultados são apresentados como média ± erro-padrão da média (EPM), acompanhados de p bruto e q ajustado. Para latências em que o evento não ocorreu até o fim do teste, o limite máximo corresponde à duração do ensaio e foi interpretado como dado censurado. A análise temporal do NTT foi considerada medida repetida do mesmo indivíduo e utilizada como complemento descritivo/inferencial da resposta ao longo dos três segmentos.

Resultados e Discussões

A análise integrada revelou um padrão consistente de modulação comportamental associado ao enriquecimento auditivo. No Novel Tank Test (NTT), o tratamento Música promoveu maior exploração da região superior do aquário e aumento da atividade

locomotora, acompanhado de redução da imobilidade. O tempo na zona superior (UZ) aumentou de 21,99 ± 13,15 s no Controle para 253,48 ± 11,62 s na Música (Mann-Whitney; p=0,00036; q=0,0020), enquanto o tempo na zona inferior (LZ) diminuiu de 236,03 ± 42,74 s para 16,23 ± 5,19 s (p=0,00057; q=0,0020). Não houve diferença para o tempo na zona média (MZ; q=0,7546), indicando que a principal alteração espacial ocorreu na redistribuição entre as regiões inferior e superior.

A atividade locomotora acompanhou essa redistribuição espacial. A distância total percorrida aumentou de 332,20 ± 114,77 cm para 519,73 ± 30,72 cm (p=0,0081; q=0,0141), correspondendo a um aumento de aproximadamente 56,4%. A velocidade média passou de 0,92 ± 0,32 para 1,44 ± 0,09 cm/s (p=0,0081; q=0,0141), aumento de aproximadamente 56,5%. Em sentido oposto, a imobilidade diminuiu de 39,36 ± 12,90 s para 3,31 ± 1,03 s (p=0,0235; q=0,0274), redução de aproximadamente 91,6%. As entradas na UZ também aumentaram, de 2,22 ± 1,23 para 7,22 ± 1,26 (p=0,0218; q=0,0274). Em conjunto, esses resultados demonstram que a resposta comportamental não se restringiu à ocupação de determinada zona, mas envolveu maior exploração do ambiente, maior deslocamento e menor permanência imóvel.

A análise temporal do NTT reforçou a persistência da maior exploração da UZ no grupo Música. A diferença entre os tratamentos esteve presente nos três segmentos de 120 s, com q=0,0062 no primeiro segmento e q=0,0024 nos dois segmentos seguintes. Para distância percorrida e imobilidade, o efeito foi mais evidente nos períodos iniciais e perdeu força em alguns segmentos posteriores. Esse padrão sugere possível adaptação de parte da resposta locomotora ao longo dos seis minutos de teste, enquanto a redistribuição vertical permaneceu mais estável.

No Social Preference Test (SPT), os animais do tratamento Música também apresentaram maior atividade locomotora. A distância total aumentou de 62,98 ± 12,42 cm no Controle para 113,13 ± 12,66 cm na Música (Mann-Whitney; p=0,0036; q=0,0119), enquanto a velocidade média passou de 1,05 ± 0,21 para 1,89 ± 0,21 cm/s (p=0,0036; q=0,0119). A frequência de entradas na zona social esquerda (SZE) aumentou de 0,44 ± 0,24 para 2,22 ± 0,15 (p=0,00057; q=0,0057), demonstrando maior frequência de acesso a essa zona específica.

Entretanto, a análise bilateral das zonas sociais mostrou que o aumento das entradas na SZE não deve ser interpretado isoladamente como aumento global da sociabilidade. O tempo na SZE apresentou diferença nominal, mas não permaneceu significativo após correção por FDR (13,43 ± 8,75 s versus 26,33 ± 5,38 s; q=0,0972). Da mesma forma, não houve diferença no tempo na zona social direita (SZD; 24,14 ± 7,56 s versus 16,32 ± 4,85 s; q=0,5597). Consequentemente, o tempo social total, calculado pela soma SZE+SZD, foi semelhante entre Controle (37,58 ± 7,41 s) e Música (42,66 ± 4,11 s; q=0,5597). O índice de preferência social também não diferiu entre os tratamentos (q=0,5597).

Esses resultados indicam que o enriquecimento auditivo modificou principalmente a dinâmica de exploração durante o contexto social, sem evidência estatística de aumento do tempo global de permanência próximo aos coespecíficos. O maior número de entradas em apenas uma das zonas sociais pode refletir uma combinação entre exploração, escolha espacial e lateralidade, devendo ser considerado um resultado complementar, e não evidência isolada de maior sociabilidade. A imobilidade no SPT

apresentou tendência de redução no grupo Música, porém não permaneceu significativa após a correção por FDR (q=0,0972).

A convergência entre NTT e SPT ocorreu principalmente no componente locomotor. Em dois contextos comportamentais distintos, a exposição à música esteve associada a maior deslocamento. No NTT, esse aumento ocorreu juntamente com maior utilização da UZ e menor imobilidade; no SPT, ocorreu sem aumento significativo do tempo social total. Esse padrão permite uma interpretação mais específica dos resultados: o enriquecimento auditivo esteve associado à modulação do estado exploratório dos juvenis e da maneira como utilizaram o ambiente, em vez de produzir simplesmente maior sociabilidade.

Os resultados dialogam com Marchetto et al. (2021), que observaram modulação de respostas comportamentais associadas à ansiedade em zebrafish expostos à música clássica, embora sem redução significativa do cortisol. Também são coerentes com Niu et al. (2025), que destacam que os efeitos do enriquecimento musical dependem das características do estímulo e da espécie avaliada. Nesse estudo, o desempenho no NTT não foi alterado em zebrafish e guppies, enquanto, no presente experimento, Amphiprion ocellaris apresentou acentuada redistribuição vertical. Essa diferença reforça o caráter espécie-específico das respostas ao enriquecimento auditivo e evidencia a importância do desenvolvimento de protocolos direcionados a peixes ornamentais marinhos.

A literatura envolvendo Vivaldi em zebrafish também contribui para contextualizar o estímulo empregado. Barcellos et al. (2018) expuseram zebrafish adultos a sessões de música de Vivaldi a 65–75 dB e relataram frequências de 330–506 Hz, mensuradas fora da água por aplicativo de nível sonoro. Os autores observaram alterações comportamentais e fisiológicas, incluindo menor resposta semelhante à ansiedade no NTT, sem efeito evidente sobre o cortisol corporal total. Esses valores são utilizados apenas como referência de um protocolo anterior com Vivaldi e não representam medições acústicas realizadas nos aquários do presente estudo.

Para A. ocellaris, estudos demonstram capacidade de detecção acústica em uma faixa relativamente ampla. Parmentier, Colleye e Mann (2009) registraram detecção entre 75 e 1.800 Hz, com maior sensibilidade abaixo de 200 Hz, enquanto Colleye et al. (2011) relataram frequência dominante média de 742 ± 124 Hz para a espécie. Trabalhos com anemonefish também relacionam vocalizações a interações sociais, submissão, conflito e hierarquia baseada no tamanho (Yllan; Rueger, 2025). Esse conjunto de informações torna pertinente a avaliação do comportamento social, mas os dados obtidos não permitem afirmar que a música tenha reproduzido sinais de coespecíficos ou que determinada faixa de frequência tenha sido responsável pelas respostas observadas. O achado demonstrado pelo presente experimento permanece comportamental: a exposição musical esteve associada principalmente a mudanças na exploração espacial e na atividade locomotora.

Os track plots gerados pelo ANY-maze® foram utilizados como recurso visual complementar para representar a trajetória do centro do animal durante os ensaios. Essas representações permitem observar qualitativamente diferenças na extensão e na distribuição das trajetórias entre indivíduos e tratamentos, mas não substituem as comparações estatísticas. A interpretação inferencial permaneceu baseada nas variáveis

quantitativas previamente estabelecidas, evitando a seleção de trajetórias apenas por sua aparência visual.

A utilização conjunta do NTT e do SPT permitiu identificar a convergência das respostas comportamentais em dois contextos distintos: exploração de um ambiente novo e comportamento diante de coespecíficos. Enquanto o NTT evidenciou maior exploração vertical, maior atividade locomotora e menor imobilidade no grupo Música, o SPT confirmou o aumento do componente locomotor, sem evidência de aumento global da sociabilidade. Assim, os resultados apontam para um efeito predominantemente exploratório do enriquecimento auditivo e reforçam a importância de integrar diferentes parâmetros comportamentais na avaliação do bem-estar. Para estudos futuros, recomenda-se considerar as latências máximas como observações censuradas e interpretar bilateralmente as zonas sociais, evitando atribuir a preferência por apenas uma lateral a um aumento da sociabilidade.

Conclusão

O enriquecimento auditivo com música clássica modificou de forma consistente o comportamento de juvenis de Amphiprion ocellaris nas condições experimentais avaliadas. No Novel Tank Test (NTT), os animais expostos à música apresentaram maior exploração da zona superior, aumento da distância percorrida, da velocidade e da frequência de entradas nessa região, além de expressiva redução da imobilidade. Esses resultados indicam uma mudança no padrão de utilização do ambiente, caracterizada por maior atividade locomotora e exploração espacial.

No Social Preference Test (SPT), a música também esteve associada ao aumento da distância percorrida e da velocidade, além de maior frequência de entradas na zona social esquerda. Entretanto, o tempo social total, considerando conjuntamente as duas zonas sociais (SZE+SZD), não diferiu entre os tratamentos. Dessa forma, os resultados não demonstram aumento global da sociabilidade, mas reforçam um efeito predominantemente relacionado à exploração e à atividade locomotora.

A convergência entre NTT e SPT constitui um dos principais achados do estudo, pois o aumento do deslocamento foi observado em dois contextos comportamentais distintos. No NTT, esse padrão ocorreu juntamente com maior utilização da região superior e menor imobilidade; no SPT, ocorreu sem alteração significativa do tempo social total. Assim, nas condições avaliadas, o enriquecimento auditivo esteve associado principalmente à modulação do estado exploratório dos juvenis e da maneira como utilizaram o ambiente.

A utilização do ANY-maze® e a integração dos dois testes forneceram uma abordagem objetiva para diferenciar ocupação espacial, atividade locomotora e resposta social. Os resultados contribuem para a construção de protocolos comportamentais direcionados a peixes ornamentais marinhos e apontam o enriquecimento auditivo como uma abordagem promissora, não invasiva e de baixo custo para estudos relacionados ao bem-estar em cativeiro. Entretanto, seus efeitos devem ser considerados espécie-específicos e dependentes das características do estímulo empregado.

Como continuidade, recomenda-se ampliar o número de animais e o período experimental, avaliar diferentes estímulos e intensidades sonoras e caracterizar o campo acústico no interior dos aquários por meio de hidrofone calibrado. A integração das respostas comportamentais com indicadores fisiológicos, como o cortisol, também poderá contribuir para distinguir aumento da atividade, adaptação ao ambiente e redução do estresse. Estudos futuros poderão ainda investigar a influência de características como tamanho corporal, hierarquia e sinais acústicos de coespecíficos, ampliando a compreensão dos efeitos da paisagem sonora sobre o comportamento e o bem-estar de A. ocellaris em cultivo.

Referências

ARECHAVALA-LOPEZ, P. et al. Environmental enrichment in fish aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture, v. 14, p. 704-728, 2022. DOI: 10.1111/raq.12620.

MARCHETTO, L. et al. Auditory environmental enrichment prevents anxiety-like behavior, but not cortisol responses, evoked by 24-h social isolation in zebrafish. Behavioural Brain Research, v. 404, 113169, 2021. DOI: 10.1016/j.bbr.2021.113169.

NIU, T.; XIANG, B.; HUANG, P.; YANG, X.; CHAI, L. Effects of music enrichment on the welfare of small ornamental fishes. Aquaculture Reports, v. 43, 102950, 2025. DOI: 10.1016/j.aqrep.2025.102950.

BARCELLOS, H. H. A. et al. The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. PeerJ, v. 6, e5162, 2018. DOI: 10.7717/peerj.5162.

PARMENTIER, E.; COLLEYE, O.; MANN, D. Hearing ability in three clownfish species. Journal of Experimental Biology, v. 212, n. 13, p. 2023-2026, 2009. DOI: 10.1242/jeb.030270.

COLLEYE, O.; FREDERICH, B.; VANDERWALLE, P.; CASADEVAL, M.; PARMENTIER, E. Interspecific variation of calls in clownfishes: degree of similarity in closely related species. BMC Evolutionary Biology, v. 11, 365, 2011. DOI: 10.1186/1471-2148-11-365.

COLLEYE, O.; PARMENTIER, E. Overview on the diversity of sounds produced by clownfishes (Pomacentridae): importance of acoustic signals in their peculiar way of life. PLoS ONE, v. 7, n. 11, e49179, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0049179.

YLLAN, L.; RUEGER, T. 'What Does the Anemonefish Say?': Investigating Amphiprion percula's acoustic behaviour. Ecology and Evolution, v. 15, n. 11, e72479, 2025. DOI: 10.1002/ece3.72479.

Anexos



Figura 1 - Síntese do delineamento experimental do Novel Tank Test (NTT) e Social Preference Test (SPT), com as zonas virtuais utilizadas no ANY-maze®.



tabela do delineamento experimental do Novel Tank Test (NTT) e Social Preference Test (SPT), com as zonas virtuais utilizadas no ANY-maze®. Fonte: elaboração própria com base no protocolo experimental.



Figura 2 - Principais respostas comportamentais no Novel Tank Test (NTT; 360 s). Barras representam média ± EPM e pontos representam valores individuais (n=9 por tratamento). A significância foi expressa por q ajustado pelo procedimento de Benjamini-Hochb



Figura 3 - Principais respostas comportamentais no Social Preference Test (SPT; 60 s). Barras representam média ± EPM e pontos representam valores individuais (n=9 por tratamento). São apresentados distância, velocidade, entradas na SZE, tempo social tota



Figura 4 - Contexto bioacústico utilizado para fundamentar a investigação do enriquecimento auditivo em Amphiprion ocellaris. A figura reúne faixas descritas na literatura e não representa análise espectral do estímulo utilizado no experimento. Fonte: ela



Tabela 2 - Resultados principais do Social Preference Test (SPT), 60 s. São apresentados os valores de média ± EPM para os tratamentos Controle e Música, teste estatístico, p bruto, q ajustado pelo procedimento de Benjamini-Hochberg (FDR), tamanho de efei



Figuras 5, 6, 7 e 8 - Track plots representativos obtidos no ANY-maze® nos contextos NTT e SPT, comparando os tratamentos Controle e Música. Figura 5: NTT Controle; Figura 6: NTT Música; Figura 7: SPT Controle; Figura 8: SPT Música. As trajetórias represe

CÓDIGO: SB1645

AUTOR: ALANA DE MEDEIROS DANTAS

ORIENTADOR: JONAS IVAN NOBRE OLIVEIRA

TÍTULO: Propósitos terapêuticos e perfis toxicológicos in silico de agonistas do receptor de orexina 2

Resumo

Os agonistas seletivos do receptor de orexina 2 (OX2R) representam uma estratégia terapêutica para condições associadas à sonolência excessiva. Este trabalho reuniu os estudos realizados sobre danavorexton (TAK-925), oveporexton (TAK-861) e alixorexton (ALKS 2680), organizando-os segundo seus propósitos terapêuticos e perfis toxicológicos in silico. O danavorexton foi investigado como agonista intravenoso para promoção da vigília e reversão da depressão respiratória induzida por opioides; o oveporexton, como tratamento oral para narcolepsia tipo 1; e o alixorexton, como candidato oral para narcolepsia e hipersonia idiopática. Foram analisadas predições do ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0, ADMET-AI e Pred-hERG 5.0. As três moléculas receberam classificação Non-blocker no Pred-hERG. Para o danavorexton, as principais questões envolveram toxicidade respiratória, hepatotoxicidade e genotoxicidade. No oveporexton, destacaram-se sinais respiratórios, hepáticos, genotóxicos e divergências entre modelos de hERG. No alixorexton, foram priorizadas toxicidades respiratória, hepática e renal, além de micronúcleo. Os resultados constituem hipóteses de triagem e indicam ensaios de validação, sem definir segurança ou toxicidade clínica. A abordagem contribui para o desenvolvimento responsável de terapias para narcolepsia e outras hipersonolências, em consonância com a ODS 3.

Palavras-chave: Orexina; OX2R; narcolepsia; hipersonolência; toxicologia in silico.

TITLE: Therapeutic purposes and in silico toxicological profiles of OX2R agonists

Abstract

Selective orexin 2 receptor (OX2R) agonists represent a therapeutic strategy for disorders associated with excessive sleepiness. This study brought together research on danavorexton (TAK-925), oveporexton (TAK-861), and alixorexton (ALKS 2680), organized according to their therapeutic purposes and individual in silico toxicological profiles. Danavorexton was investigated as an intravenous agonist for wake promotion and reversal of opioid-induced respiratory depression; oveporexton as an oral treatment for narcolepsy type 1; and alixorexton as an oral candidate for narcolepsy and idiopathic hypersomnia. Predictions from ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0, ADMET-AI, and Pred-hERG 5.0 were analyzed. All three compounds received a Non-blocker classification in Pred-hERG. For danavorexton, the main questions involved respiratory toxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. Oveporexton showed respiratory, hepatic, genotoxic, and model-dependent hERG findings. Alixorexton raised respiratory, hepatic, renal, and micronucleus-related questions. These results represent screening hypotheses and identify validation experiments without defining clinical safety or toxicity. The approach supports the responsible development of therapies for narcolepsy and other hypersomnolence disorders and is aligned with Sustainable Development Goal 3.

Keywords: Orexin; OX2R; narcolepsy; hypersomnia; in silico toxicology.

Introdução

A narcolepsia e a hipersonia idiopática são doenças neurológicas crônicas caracterizadas por sonolência diurna excessiva, comprometimento funcional e redução da qualidade de vida. As orexinas A e B, produzidas no hipotálamo, atuam nos receptores OX1R e OX2R e participam da estabilização dos estados de vigília. Na narcolepsia tipo 1, a perda de neurônios produtores de orexina compromete essa sinalização, fornecendo uma base mecanística para o desenvolvimento de agonistas seletivos de OX2R.

O danavorexton, inicialmente denominado TAK-925, é um agonista intravenoso seletivo e penetrante no sistema nervoso central. Seu programa investigou a promoção aguda da vigília em narcolepsia, hipersonia idiopática e sonolência associada à apneia obstrutiva do sono. O composto também foi avaliado na depressão respiratória induzida por opioides, com melhora da ventilação sem perda da analgesia. Assim, seu propósito foi demonstrar a viabilidade farmacológica da ativação de OX2R e explorar aplicações agudas.

O oveporexton, TAK-861, é um agonista oral seletivo de OX2R desenvolvido para o tratamento da narcolepsia tipo 1. Seu objetivo terapêutico é reduzir a sonolência diurna excessiva e outros sintomas relacionados à deficiência de orexina. O alixorexton, ALKS 2680, também é administrado por via oral e vem sendo investigado em narcolepsia tipo 1, narcolepsia tipo 2 e hipersonia idiopática, abrangendo condições com diferentes manifestações de sonolência patológica.

A segurança é decisiva para medicamentos destinados a doenças crônicas. O desenvolvimento do firazorexton, TAK-994, foi interrompido após elevações clinicamente relevantes de enzimas hepáticas, e estudos posteriores sugeriram

participação de bioativação e ligação covalente dependente do metabolismo. Esse caso não comprova efeito de classe, mas reforça a necessidade de investigar individualmente cada composto e seus metabólitos.

Ferramentas in silico permitem rastrear múltiplos endpoints toxicológicos e orientar ensaios experimentais. Como cada plataforma utiliza conjuntos de treinamento e definições próprias, os resultados devem preservar o significado de cada endpoint e não podem ser convertidos em uma classificação global de segurança. O objetivo deste trabalho foi descrever os propósitos terapêuticos e os perfis toxicológicos in silico de danavorexton, oveporexton e alixorexton, contextualizando as predições com evidências experimentais e clínicas e identificando prioridades de validação.

Metodologia

Foram integrados três estudos de toxicologia in silico, um para danavorexton, um para oveporexton e um para alixorexton. Cada molécula foi analisada separadamente e relacionada ao seu propósito terapêutico. O escopo foi restrito a endpoints de toxicidade. Propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção foram utilizadas somente quando necessárias para interpretar exposição, metabólitos ou bioativação.

Foram examinadas as saídas das plataformas ADMETlab 3.0, ProTox 3.0, Deep-PK, admetSAR 3.0 e ADMET-AI. O Pred-hERG 5.0 foi incorporado à avaliação do potencial de bloqueio do canal hERG, com resultado Non-blocker para danavorexton, oveporexton e alixorexton. Os dados foram organizados por molécula, ferramenta, domínio toxicológico, endpoint, valor ou classe e tipo de saída. Classes binárias, probabilidades, escores contínuos e valores de regressão foram mantidos em suas escalas originais.

Valores ausentes não foram convertidos em resultados negativos. Métricas gerais dos modelos, como AUC, MCC, R^2 e erro médio, foram tratadas como características de desempenho das plataformas, e não como confiança específica para uma molécula. Não foram calculadas médias entre ferramentas, votação majoritária, percentuais de consenso ou escores compostos.

A interpretação preservou a especificidade dos endpoints. Bloqueio de hERG foi separado de cardiotoxicidade ampla; hepatotoxicidade humana foi distinguida de lesão hepática induzida por fármacos (DILI); e Ames, genotoxicidade ampla e micronúcleo foram tratados como desfechos diferentes. Divergências entre plataformas permaneceram explícitas.

As predições foram contextualizadas com artigos experimentais e clínicos, registros de ensaios e documentos regulatórios presentes nos estudos-base. A correspondência foi considerada direta somente quando a evidência avaliava o mesmo composto e o mesmo fenômeno biológico. QTc clínico não foi tratado como ensaio direto de hERG; aumento da ventilação sob opioides não foi utilizado como teste de lesão pulmonar; sintomas

urinários não foram interpretados como nefrotoxicidade; e efeitos de vigília não foram convertidos em neurotoxicidade estrutural. Dados de TAK-994 foram usados apenas como justificativa indireta para investigar metabolismo reativo.

As prioridades de validação foram definidas qualitativamente pela relevância do endpoint, consistência ou divergência das predições, disponibilidade de evidência externa e existência de um ensaio capaz de resolver a incerteza. A priorização expressa valor informacional, não probabilidade ou gravidade clínica.

Resultados e Discussões

Cada estudo-base continha 179 registros em nível de endpoint. Foram identificadas 159 saídas específicas para danavorexton, 148 para oveporexton e 150 para alixorexton antes da atualização do Pred-hERG 5.0. A classificação Non-blocker foi acrescentada ao perfil de cada molécula sem alterar os demais resultados.

O danavorexton foi estudado como agonista intravenoso para promoção da vigília e reversão da depressão respiratória induzida por opioides. No domínio cardíaco, além do Pred-hERG Non-blocker, o ADMETlab apresentou 0,332, o ADMET-AI 0,62, o ProTox retornou Inactive e os classificadores admetSAR foram negativos. A ausência de ensaio público direto de hERG mantém a necessidade de patch-clamp relacionado à exposição livre. Para toxicidade respiratória, ADMETlab retornou 0,362, ProTox e admetSAR produziram classes positivas e Deep-PK indicou Toxic. Os estudos que mostraram melhora da ventilação avaliam farmacologia respiratória, não lesão pulmonar. Na área hepática, ADMETlab 0,753 e ProTox Active indicaram hepatotoxicidade humana, enquanto DILI foi baixo ou negativo em ADMETlab 0,191, ADMET-AI 0,34, admetSAR classe 0 e Deep-PK Safe. Ames foi heterogêneo e o micronúcleo divergiu entre Deep-PK Toxic e admetSAR classe 0.

O oveporexton foi desenvolvido como terapia oral para narcolepsia tipo 1. O Pred-hERG retornou Non-blocker, mas os demais modelos foram divergentes: ADMETlab 0,231 e ProTox Inactive contrastaram com ADMET-AI 0,86 e classificadores positivos do admetSAR. Essa incerteza exige ensaio eletrofisiológico com IC50 e margem de exposição. A toxicidade respiratória foi indicada por ADMETlab 0,756, ProTox Active, Deep-PK Toxic e admetSAR classe 1. Para hepatotoxicidade humana, ADMETlab apresentou 0,977 e ProTox Active. Para DILI, ADMETlab retornou 0,982, ADMET-AI 0,68 e admetSAR classe 1, enquanto Deep-PK indicou Safe. Ames foi heterogêneo e dois modelos foram positivos para micronúcleo. A evidência não clínica de micronúcleo positivo in vitro e negativo in vivo demonstra a influência de exposição e metabolismo. Estudos negativos de carcinogenicidade em ratos e camundongos TG-rasH2 oferecem contexto experimental direto.

O alixorexton foi investigado por via oral para narcolepsia e hipersonia idiopática. O Pred-hERG retornou Non-blocker; ADMETlab apresentou 0,142, ADMET-AI 0,43, admetSAR foi negativo e ProTox Inactive. A análise concentração-QTc fornece contexto clínico, mas não substitui patch-clamp. Para toxicidade respiratória, ADMETlab retornou 0,542, ProTox Active, Deep-PK Toxic e admetSAR classe 1.

Hepatotoxicidade humana foi indicada por ADMETlab 0,899 e ProTox Active. DILI foi divergente: ADMETlab 0,882 e ADMET-AI 0,59 contrastaram com Deep-PK Safe e admetSAR classe 0. A nefrotoxicidade também variou entre ADMETlab 0,794, ProTox Inactive e admetSAR classe 0. Ames foi heterogêneo e Deep-PK e admetSAR foram positivos para micronúcleo.

Os perfis indicam perguntas específicas para cada programa. A classificação Non-blocker constitui evidência de triagem, mas deve ser interpretada com exposição e confirmação experimental. Sinais respiratórios requerem ensaios de lesão pulmonar, e não apenas medidas ventilatórias. Questões hepáticas justificam avaliação de metabólitos, bioativação, colestase e citotoxicidade dependente do metabolismo. Ames e micronúcleo experimentais são necessários para resolver as incertezas genotóxicas.

Conclusão

Os trabalhos permitiram organizar danavorexton, oveporexton e alixorexton segundo seus propósitos terapêuticos e perfis toxicológicos in silico. O danavorexton foi abordado como agonista intravenoso de prova de conceito para promoção da vigília e depressão respiratória induzida por opioides; suas prioridades envolveram hERG, toxicidade respiratória, hepatotoxicidade, metabólitos e genotoxicidade. O oveporexton foi estudado como tratamento oral para narcolepsia tipo 1; seu perfil indicou necessidade de esclarecer hERG, toxicidade respiratória, hepatotoxicidade/DILI e genotoxicidade. O alixorexton foi analisado como candidato oral para narcolepsia e hipersonia idiopática; foram priorizadas questões cardíacas, respiratórias, hepáticas, renais e genotóxicas.

As três moléculas receberam classificação Non-blocker no Pred-hERG 5.0. Esse resultado constitui uma predição de triagem e não substitui ensaios eletrofisiológicos com avaliação da margem de exposição. As principais etapas futuras incluem patch-clamp de hERG, caracterização de metabólitos e bioativação hepática, ensaios de toxicidade respiratória intrínseca, biomarcadores renais e testes padronizados de Ames e micronúcleo. A abordagem transforma predições em perguntas experimentais verificáveis e contribui para o desenvolvimento responsável de terapias para narcolepsia e outras hipersonolências, alinhando-se à ODS 3.

Referências

1. Yukitake H, et al. TAK-925, an orexin 2 receptor-selective agonist, shows robust wake-promoting effects in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2019;187:172794. doi:10.1016/j.pbb.2019.172794.

2. Evans R, et al. Orexin 2 receptor-selective agonist danavorexton improves narcolepsy phenotype in a mouse model and in human patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022;119:e2207531119. doi:10.1073/pnas.2207531119.

3. Mignot E, et al. Safety and pharmacodynamics of a single infusion of danavorexton in adults with idiopathic hypersomnia. Sleep. 2023;46:zsad049. doi:10.1093/sleep/zsad049.

4. van Lemmen M, et al. Danavorexton reduces opioid-induced respiratory depression and sedation without affecting analgesia in healthy men. Anesthesiology. 2025;142:628-638. doi:10.1097/ALN.0000000000005375.

5. Mitsukawa K, et al. TAK-861 produces wakefulness in monkeys and improves narcolepsy-like phenotypes in mouse models. Sci Rep. 2024;14:20838. doi:10.1038/s41598-024-70594-1.

6. Dauvilliers Y, et al. Oveporexton, an oral orexin receptor 2-selective agonist, in narcolepsy type 1. N Engl J Med. 2025;392:1905-1916. doi:10.1056/NEJMoa2405847.

7. Grunstein RR, et al. Targeting orexin 2 receptors in idiopathic hypersomnia and narcolepsy: a phase 1b study of alixorexton. J Sleep Res. 2026:e70429. doi:10.1111/jsr.70429.

8. Dauvilliers Y, et al. Oral orexin receptor 2 agonist in narcolepsy type 1. N Engl J Med. 2023;389:309-321. doi:10.1056/NEJMoa2301940.

9. Shinozawa T, et al. TAK-994 mechanistic investigation into drug-induced liver injury. Toxicol Sci. 2025;204:143-153. doi:10.1093/toxsci/kfaf003.

10. Fu L, et al. ADMETlab 3.0. Nucleic Acids Res. 2024;52:W422-W431. doi:10.1093/nar/gkae236.

11. Banerjee P, et al. ProTox 3.0. Nucleic Acids Res. 2024;52:W513-W520. doi:10.1093/nar/gkae303.

12. Myung Y, et al. Deep-PK. Nucleic Acids Res. 2024;52:W469-W475. doi:10.1093/nar/gkae254.

13. Gu Y, et al. admetSAR 3.0. Nucleic Acids Res. 2024;52:W432-W438. doi:10.1093/nar/gkae298.

14. Swanson K, et al. ADMET-AI. Bioinformatics. 2024;40:btae416. doi:10.1093/bioinformatics/btae416.

15. Sanches IH, et al. Enhancing hERG risk assessment with interpretable classificatory and regression models. Chem Res Toxicol. 2024;37:910-922. doi:10.1021/acs.chemrestox.3c00400.

CÓDIGO: SB1650

AUTOR: RUTH DE MEDEIROS ROCHA

ORIENTADOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

TÍTULO: Qual a contribuição dos dados de ciência cidadã para o conhecimento sobre as interações de frugivoria em Myrtaceae?

Resumo

Estudos ecológicos de larga abrangência geográfica frequentemente geram desafios para a obtenção de um bom esforço amostral. Para contornar essa limitação, metodologias baseadas no uso da ciência cidadã vêm ganhando expressivo espaço no meio científico. O presente estudo tem como objetivo compreender como o uso da ciência cidadã pode contribuir para o conhecimento das interações frugívoras entre aves e plantas da família Myrtaceae no Neotrópico, identificando tendências taxonômicas, espaciais e temporais nos registros levantados. A partir dos dados coletados na plataforma WikiAves, filtraram-se interações de consumo de frutos envolvendo 13 espécies de Myrtaceae. Em seguida, calculou-se a riqueza taxonômica de famílias, gêneros e espécies de aves visitantes de cada espécie vegetal, além de mapear as tendências espaciais e temporais. Os dados da plataforma contribuíram com 206 novos registros, destacando maior frequência de consumo em *Psidium guajava* (N=73), com 45,21% dos visitantes da família Psittacidae, e em *Eugenia uniflora* (N=45), com 46,67% das interações com Ramphastidae. Cerca de 99,03% dos registros do WikiAves corresponderam a registros únicos planta-animal, evidenciando a expressiva riqueza de interações entre espécies. Em comparação com a literatura de base, 63,57% das interações planta-ave foram observadas exclusivamente na plataforma de ciência cidadã, corroborando a hipótese de sua ampla complementaridade científica em amostragens ecológicas.

Palavras-chave: Ecologia. Fruto. Neotrópico. WikiAves

TITLE: What is the contribution of citizen science data to the knowledge about frugivory interactions in Myrtaceae?

Abstract

Ecological studies with broad geographic scope often generate challenges in obtaining a good sampling effort. To overcome this limitation, methodologies based on the use of

citizen science have been gaining significant ground in the scientific community. This study aims to understand how the use of citizen science can contribute to the knowledge of frugivorous interactions between birds and plants of the Myrtaceae family in the Neotropics, identifying taxonomic, spatial, and temporal trends in the collected records. From data collected on the WikiAves platform, fruit consumption interactions involving 13 Myrtaceae species were filtered. Subsequently, the taxonomic richness of families, genera, and species of birds visiting each plant species was calculated, in addition to mapping spatial and temporal trends. The platform's data was developed with 206 new records, highlighting a higher frequency of consumption in *Psidium guajava* (N=73), with 45.21% of visitors from the Psittacidae family, and in *Eugenia uniflora* (N=45), with 46.67% of interactions with Ramphastidae. Approximately 99.03% of the WikiAves records corresponded to unique plant-animal records, evidencing the significant richness of interactions between species. In comparison with the baseline literature, 63.57% of plant-bird interactions were observed exclusively on the citizen science platform, corroborating the hypothesis of its broad scientific complementarity in ecological samples.

Keywords: Ecology. Fruit. Neotropics. WikiAves

Introdução

A ciência cidadã é o processo que conecta a sociedade à pesquisa científica ao envolver os cidadãos na coleta de dados, estimulando o pensamento crítico e ambiental. (Irwin, 1995). Atualmente, diversas pesquisas em diferentes áreas do conhecimento começaram a utilizar a ciência cidadã para complementar e ampliar suas bases de dados. Nesse contexto, áreas como a micologia, que ainda possui lacunas quanto ao conhecimento da real diversidade de espécies, têm se beneficiado dessa abordagem, resultando em novas descobertas (Haelewaters et al., 2024). Da mesma forma, estudos sobre a invasibilidade de espécies exóticas em grandes áreas geográficas, como a Amazônia, têm sido ampliados por meio desses registros (Soares et al., 2020). A Botânica também vem ganhando com a descrição de espécies novas a partir dos registros dos cientistas-cidadãos (Abdalla, 2023). Tais iniciativas reforçam o uso da ciência cidadã para o aprofundamento e a ampliação de estudos científicos.

Quando a pergunta científica tem como área de estudo um continente inteiro, por exemplo, a coleta de dados se torna um desafio para a pesquisa. Na área da ecologia, onde buscamos entender padrões de diversidade este desafio é comum pois necessitamos abordar amplas escalas geográficas, taxonômicas e temporais. Nesse sentido, os dados de ciência cidadã têm se revelado como uma rica fonte de informações que podem ser utilizados de forma estratégica para cobrir lacunas nestas três escalas (Alexandrino, Ghilardi-lopes e Ferraz, 2025). Estes dados de ciência cidadã, em geral, são registros pontuais agregados em plataformas onde a população comum e acadêmica podem contribuir e também checar a validade dos registros. No Brasil há mais de 300 iniciativas como essas registradas na plataforma Cívis, dentre elas uma que se destaca é a plataforma WikiAves. Trata-se de um ambiente digital voltado à comunidade de observadores de aves, cujo objetivo é divulgar e incentivar tal prática. A plataforma reúne dados de avistamentos de diferentes espécies, e favorece o compartilhamento de registros fotográficos e sonoros, além de informações textuais sobre as espécies. Essa aproximação

entre ciência e sociedade amplia o acesso ao conhecimento e desperta o interesse de novos estudantes e pesquisadores pela área (Albagli, 2022)

Os dados da plataforma WikiAves são utilizados em grande escala para ampliação de bancos de dados e análises em ecologia de aves, ajudando a descrever e quantificar a riqueza de espécies em diversas regiões. No estado do Paraná, 96 espécies ameaçadas de extinção foram mapeadas em 126 municípios usando esta plataforma, revelando que a distribuição dessas aves está associada aos remanescentes de vegetação e à densidade populacional humana (Silva et al., 2023). Registros da plataforma também favoreceram estudos de interações ecológicas e o comportamento alimentar das aves. Mais de 71 mil fotografias foram consultadas para construir um banco de dados com eventos de alimentação, revelando a importância de predadores 'não convencionais' (como garças e corujas consumindo vertebrados) na estrutura trófica das aves neotropicais (Latorres, 2022). Os registros geralmente podem incluir atividades de forrageamento das aves e assim podemos recuperar, por exemplo, interações ecológicas de animal-planta, assim como a frugivoria e dispersão de sementes (Fernandes, 2022).

Baseado na relevância de plataformas de ciência cidadã na pesquisa científica, este projeto visa responder a uma questão de ampla escala: quais aves se alimentam de Myrtaceae nas Américas? Partindo do trabalho de Moreira (2024), buscamos analisar como registros de ciência cidadã obtidos em ambientes digitais como WikiAves complementam os dados de observações de campo revisados e compilados pelo autor, testando a congruência entre diferentes fontes de dados biológicos e o potencial para preencher lacunas registradas no banco de dados inicial.

Metodologia

Os dados de frugivoria foram coletados a partir de plataforma de ciência cidadã que engloba registros fotográficos de aves se alimentando em plantas, sendo o WikiAves (https://www.wikiaves.com.br/) a plataforma escolhida aqui por ser a mais antiga estabelecida e consolidada na América do Sul.

O critério de busca foi “Myrtaceae” que retornou 16 espécies sendo destas 3 exóticas (i.e. não nativas do Neotrópico) que foram excluídas das análises (Callistemon viminalis, Eucalyptus sp. e Syzygium cumini). Foram considerados como interação frugívoro-planta apenas os registros onde era possível atribuir o consumo do fruto a partir da foto ou quando era listado nas observações que ele estava se alimentando da planta. Assim, qualquer registro onde a ave estivesse apenas pousada na copa da árvore, se alimentando de outra espécie de planta ou apenas em voo (sem se alimentar) foi excluída dos dados.

Os nomes das espécies de Myrtaceae foram harmonizados seguindo Flora e Funga do Brasil para espécies nativas (https://floradobrasil.jbrj.gov.br) e Plants of the World - POWO - para as demais espécies (https://powo.science.kew.org). Inicialmente, as informações coletadas foram inseridas em uma planilha eletrônica, estruturada com o número total de registros de frugivoria por espécie vegetal, contendo seu nome comum e científico. Essa primeira etapa promove um panorama geral de quantos dados seriam trabalhados e se havia uma quantidade relevante para a pesquisa.

Em seguida, foi produzida uma nova tabela com informações mais específicas, nela registramos todas as informações relevantes de cada foto de frugivoria em Myrtaceae presente na plataforma. As colunas foram classificadas nos tópicos:

- Nome científico usado na busca;
- Registro das aves mais atraídas pela planta, adicionando o seu nome científico;
- Data da foto;
- Localidade geográfica;
- Observações do autor, se houver
- Nome do autor,
- ID de fotografia produzido pelo site;
- Nome em forma de citação do autor;
- Observações extras se for necessário.

Em continuidade, foi feita a comparação de dados obtidos a partir das plataformas de ciência cidadã com os dados que já foram estudados na pesquisa base (i.e. Moreira 2024), e essa relação de informações possibilitou a identificação de espécies que caracterizam novos registros de frugivoria na família Myrtaceae.

Análise dos dados:

Foi calculada a riqueza taxonômica de famílias, gêneros e espécies de aves visitando cada espécie de Myrtaceae. Os registros foram espacializados utilizando o software R Studio para verificar tendências geográficas e elaborei a série temporal destes registros. O banco de dados obtido a partir de ciência cidadã foi comparado ao de Moreira (2024) baseado em observações de campo e as similaridades e discrepâncias foram discutidas.

Recentemente, estudos apontam para problemas relativos ao uso de inteligência artificial para elaboração de imagens que são incluídas em sites de plataformas de ciência cidadã, (Imagens, 2026). Para minimizar potenciais problemas deste tipo, o banco de dados foi curado por um especialista em taxonomia e ecologia de aves.

Resultados e Discussões

Um total de 13 espécies de Myrtaceae foram analisadas a partir da plataforma WikiAves (Tabela 1), através de um total de 206 registros fotográficos de frugivoria. *Psidium guajava,* com 73 registros, foi a espécie mais visitada. *Eugenia uniflora*, com 45 registros, foi a segunda e *Plinia peruviana*, com 27 registros, a terceira. Em contrapartida, as espécies que menos foram obtidos registros de frugivoria foram as espécies *Plinia edulis* e *P. rivularis,* ambas com apenas uma captura fotográfica cada.

Quatro espécies de Myrtaceae não tinham registro de frugivoria documentado na literatura (em comparação ao banco de dados de Moreira 2024), sendo elas a C*ampomanesia phaea, Plinia edulis, P. rivularis* e *Myrciaria floribunda.*

As 13 espécies nativas de Myrtaceae foram visitadas por 116 espécies de aves que estão incluídas em 18 famílias. Dentre elas, Psittacidae destacou-se por apresentar uma maior frequência de interações através de 37 espécies fotografadas consumindo Myrtaceae (Tabela 2). Com elevada interação entre Psittacidae e *Psidium guajava*, 45,21% das 73 interações registradas em *Psidium guajava* estão associadas à família Psittacidae. Em segundo estiveram os Thraupideos, com 30 espécies interagindo de forma bem distribuída em quase todas as espécies de Myrtaceae (Tabela 2).

As espécies *Pyrrhura frontalis* e *Psittacara leucophthalmus* foram as aves que visitaram a maior diversidade de Myrtaceae, 8 e 6 espécies respectivamente (Tabela 2).

Sete dos 15 registros referentes à família de aves Ramphastidae, correspondem a interações com a espécie vegetal *Eugenia uniflora*. Os demais registros foram dispostos de maneira não específica com outras espécies de Myrtaceae, sendo a maioria dessas interações únicas com a família Ramphastidae (Tabela 2).

Os dados refletem que a maioria dos registros da interação entre planta e ave ocorreu uma única vez na plataforma WikiAves. Isso demonstra que, de um total de 206 registros, 204 correspondem a registros únicos (99,03%). O que evidencia a riqueza de interações entre espécies que o atual estudo com a plataforma de ciência cidadã integrou.

O primeiro registro fotográfico de interação com Myrtaceae encontrado na plataforma data de 2005. Há uma tendência crescente no aumento dos registros ao longo dos anos, com pico registrado no triênio 2023-2025, que totalizou 57 interações no período (Fig. 2). Até o momento da análise (mês de 2026), foram contabilizados 206 registros no período de 2005 a 2026, dos quais apenas 4 correspondem ao ano de 2026.

A análise espacial dos dados revelou uma tendência geral de concentração no território brasileiro com 205 fotografias, além de uma ocorrência pontual no noroeste da América do Sul, com um registro na Colômbia. Entre as latitudes 20°S e 30°S observou-se uma concentração expressiva no volume de observações (Fig. 3), abrangendo principalmente as regiões Sudeste e Sul do Brasil, que lideraram em registros com destaques para São Paulo com 43 registros, Minas Gerais com 29, Rio Grande do Sul com 19. Após essa área de maior densidade, a amostragem distribuiu-se de forma mais homogênea pelas demais regiões do país, como no Centro-Oeste, com Mato Grosso do Sul e Goiás apontando 7 registros para cada Estado. No Nordeste se destaca a Bahia com 3 registros e Pernambuco com 4. Na região Norte, o Estado do Amazonas obteve 6 registros e o Pará 5. De maneira geral, as capitais do Sudeste concentraram o maior volume de dados por ponto amostral, acompanhadas por municípios como Linhares (ES), que registrou 5 ocorrências.

De maneira geral, foi possível por meio deste trabalho, comparar de que forma a abordagem metodológica de coleta de dados utilizando a ciência cidadã pôde acrescentar aos dados de observação em campo realizados na pesquisa base (Moreira, 2024), a partir do esquema de diagrama de Venn representado na “Figura 4”, e então servir como complementação e robustez na pesquisa proposta de frugivoria de aves na família Myrtaceae. A figura reúne as interações das duas abordagens, uma em azul (literatura base), outra em amarelo (ciência cidadã) e conclui que a sobreposição de registros idênticos (mesma espécie vegetal para a mesma espécie de ave) dispostas na cor verde refere-se a uma minoria, cerca de 15,5% dos dados, demonstrando assim como os

registros oriundos de projetos de ciência cidadã atuam na complementaridade aos dados da pesquisa científica, do qual neste estudo, representou cerca de 63,57%.

Discussão:

Psidium guajava, Eugenia uniflora e *Plinia peruviana* foram as espécies de Myrtaceae que apresentaram o maior número de registros na plataforma. Esse padrão pode indicar uma elevada taxa de cultivo dessas espécies, relacionado ao seu valor comercial, ao amplo consumo humano na alimentação cotidiana e ao uso na farmacobotânica popular em razão de suas propriedades medicinais. (Santos e Santos, 2012; Souza et al., 2018; Pontes, 2023). Esses fatores aumentam a frequência dessas espécies no ambiente e, consequentemente, a probabilidade de serem registradas em interações com frugívoros.

Com relação às aves, os psitacídeos lideram o número de registros nos levantamentos. E isso pode estar relacionado em grande parte, ao forte apelo visual dessas espécies, ao tamanho corporal médio, que varia de 12 cm até 90 cm dependendo da espécie, o que facilita a visualização em maiores distâncias, reforçado também pelo padrão de plumagem com espectro de cores geralmente voltadas para o verde, amarelo, laranja e vermelho, (Heatley e Cornejo, 2015) o que fornece destaque dessas aves presentes na cobertura vegetal. Além disso, o fator comportamental se destaca em função do padrão de vocalização marcante e geralmente em bando, (Souza, 2023) características que atraem facilmente a atenção dos observadores.

Os dados provenientes da pesquisa em questão identificam um notável padrão de relação entre a família Psittacidae e a espécie *Psidium guajava*, evidenciando uma possível preferência alimentar dessas aves pelo fruto. Essa relação também está interligada ao ambiente antropizado, que estimula um maior plantio de espécies vegetais de interesse alimentar humano, como a goiaba, favorecendo esses dados de frugivoria. Embora os psitacídeos sejam reconhecidos por sua relação como predadores de sementes, o que provoca danos físicos a elas e ocasiona dessa forma a não germinação dos propágulos (Galetti & Rodrigues, 1992; Silva et al., 2013), os dados obtidos pela plataforma WikiAves reforçam também o papel dessas aves na dispersão eventual (Gressler, Pizo & Morellato, 2006). Isso ocorre devido ao transporte acidental de sementes presas ao bico e às patas, bem como à ingestão íntegra de parte delas, viabilizada pelo pequeno tamanho e pela grande quantidade de sementes de *P. guajava*.

As espécies *Pyrrhura frontalis* e *Psittacara leucophthalmus* foram as aves que visitaram uma maior diversidade de Myrtaceae, indicando que essas espécies de psitacídeos possuem um alto grau de alimentação generalista. Essa característica nos psitacídeos não se limita aos frutos de Myrtaceae, por exemplo, mas estende-se à sua dieta alimentar de forma geral, a qual pode incluir a polpa de frutos, sementes, flores, néctar e folhas de diversas espécies vegetais (Ragusa-Netto & Fecchio, 2006). Essa plasticidade garante a essas aves um maior aproveitamento nutricional em relação ao seu ambiente.

Em seguida, destacam-se os traupídeos em maior número de observações, essa família inclui aves como saíras, sanhaços e tiês. Essas aves destacam-se como frugívoras em diversos estudos e tem destaque como consumidoras em estudos com Myrtaceae como foco (Moreira, 2024 e Staggemeier, 2008). A larga escala de variação de cores de suas plumagens e o canto melódico atrativo desse grupo também atraem a visualização dos mesmos, justificando o elevado volume de avistamentos documentados na base de dados.

Os Thraupídeos demonstraram, por meio dos dados, apresentar um padrão alimentar generalista em relação ao consumo de diversas espécies de frutos de Myrtaceae. No que se refere ao seu comportamento de forrageamento, a tendência dessa família é que essa atividade de busca por frutos seja realizada em pequenos grupos ou bandos mistos (Rojas, 2007). A frequente interação de aves forrageando um determinado ambiente favorece também aos observadores o registro dessa família.

A família de aves Ramphastidae, apontou que, dos 15 registros de interações, 7 correspondem à espécie vegetal *Eugenia uniflora*. Os demais registros foram dispostos de maneira não específica com outras espécies de Myrtaceae, favorecendo sua possível preferência alimentar por essa espécie. Esse padrão também foi identificado em estudo sobre o comportamento de forrageamento de espécies de Ramphastidae, no qual a dieta, geralmente onívora, abrangeu principalmente o consumo de artrópodes, seguido de frutos (como a *Eugenia uniflora)*, além do consumo complementar de pequenos vertebrados e flores (Silva, 2015; Pizo, 2007).

De acordo com a proporção de registros ao decorrer dos anos observados, foi possível destacar que, no primeiro triênio referente aos anos de 2005 à 2007, houve poucos registros na plataforma (2), e esse fato se deve principalmente ao ano de criação do WikiAves em 19 de dezembro de 2008, (WikiAves, 2009) dessa forma, registros anteriores a essa data foram de incentivo próprio dos cientistas cidadãos. O crescente avanço de registros feitos entre 2020 à 2025 sugere a popularização da plataforma para um maior público interessado e pela aproximação popular a plataformas digitais a partir do período da pandemia do vírus SARS-CoV-2 (Figueiredo et al., 2022).

Conforme a distribuição espacial de registros fotográficos oriundos da plataforma, foi possível destacar que o Brasil lidera essa tendência geográfica, impulsionado pela popularização da plataforma ao país de criação, e a riqueza de avifauna local, embora o Brasil tenha a maior porcentagem de espécies de aves ameaçadas no Neotrópico (Collar et al., 1997). A maior frequência de registros, é abrigada na região do Sudeste, seguida do Sul, e isso pode estar inteiramente relacionado ao fator de densidade demográfica desses locais (86,92 hab./m² e 48,58 hab./m² respectivamente) sendo eles as mais populosas áreas do Brasil, (IBGE, 2010). Continuamente, o Norte ganha destaque, com mais registros que o Centro Oeste e Nordeste, e mesmo que a sua densidade populacional seja a menor do Brasil (4,12 hab./m²), tal resultado reforça o padrão do bioma amazônico ser o mais diverso do Brasil com respeito à avifauna (Marceliano e Martins, 2018), favorecendo assim, mais avistamentos e fotografias. A região Nordeste, corresponde ao menor percentual de registros, mesmo que a sua densidade demográfica seja a 3° maior do país, e tal observação não sugere baixa riqueza de avifauna, mas reforça a desigualdade de esforço amostral de regiões menos incentivadas ou favorecidas para a pesquisa (Marini e Garcia, 2005), o que estimula a necessidade da propagação de métodos de divulgação e interesse científico, como a ciência cidadã, para preencher essas lacunas.

Conclusão

A partir da comparação das duas abordagens de estudo sobre a frugivoria em Myrtaceae no Neotrópico, foi possível verificar de que forma a coleta de dados por meio da ciência

cidadã agregou às observações de campo realizadas no estudo de referência (Moreira, 2024). Essa abordagem complementou de maneira significativa os dados da pesquisa proposta, corroborando a tese de que a ciência cidadã pode atuar na complementação de dados científicos e evidenciando a importância da inclusão da comunidade no contexto da pesquisa e na popularização do conhecimento (Alexandrino, Ghilardi-Lopes e Ferraz, 2025).

Referências

ABDALA, Viitor. AGÊNCIA BRASIL. **Naturalistas amadores contribuem com descobertas científicas.** Brasília, 13 out. 2023. Disponível em:https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2023-10/naturalistas-amadores-contribuem-com-descobertas-cientificas. Acesso em: 10 mar. 2026.

ALBAGLI, Sarita. C**iência cidadã: conceitos e práticas**. Ciência & Cultura, São Paulo, v. 74, n. 2, 2022. Disponível em: https://revistacienciaecultura.org.br/?artigos=ciencia-cidada-conceitos-e-praticas.

ALEXANDRINO, Eduardo Roberto; GHILARDI-LOPES, Natalia Pirani; FERRAZ, Katia Maria Paschoaletto Micchi de Barros. **O cenário acadêmico brasileiro ao aplicar ciência cidadã em pesquisas ecológicas.** Estudos Avançados, v. 39, n. 114, p. e39114247, 2025.

APPEL, Sabrina Cristiane; DE OLIVEIRA PORFIRIO, Grasiela Edith. T**he contribution of citizen science to the knowledge on the feeding habits of Ara ararauna in an urban area of central western Brazil.** Ornitologia Neotropical, v. 34, n. 1, p. 6-10, 2023.

BARBOSA, WALCILENE MARIA. D**ieta de psitacídeos (Aves: Psittacidae) no Mato Grosso do Sul, baseada em dados de Ciência Cidadã.** Trabalho de Conclusão de Curso - Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2024.

BONILLA ROJAS, Wilian Fernando. **Hábitos alimenticios y estrategias de forrajeo de cuatro especies de aves del género Tangara (Thraupidae) en la Reserva Natural La Planada Nariño-Colombia.** 2007.

COLLAR, Nigel J.; WEGE, David C.; LONG, Adrian J. **Patterns and causes of endangerment in the New World avifauna.** Ornithological monographs, p. 237-260, 1997.

DA SILVA, João Carlos Barbosa et al. D**ispersão por aves de Psidium guajava L.(Myrtaceae) em ambiente ripário na bacia do rio Paraná, Brasil**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 34, n. 2, p. 195-204, 2013.

FERNANDES, Lucas Zordan. **Variação no grau de frugivoria das aves: uma avaliação com dados de ciência cidadã.** Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2022.

FIGUEIREDO, Eric Renato Lima et al. **Os desafios da saúde digital na pandemia de covid-19: uma revisão integrativa no scielo.** RECISATEC-REVISTA CIENTÍFICA SAÚDE E TECNOLOGIA-ISSN 2763-8405, v. 2, n. 1, p. e2182-e2182, 2022.

GALETTI, Mauro; RODRIGUES, Marcos. Comparative seed predation on pods by parrots in Brazil. Biotropica, p. 222-224, 1992.

GRESSLER, Eliana; PIZO, Marco A.; MORELLATO, L. Patrícia C. **Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil.** Brazilian Journal of Botany, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUIMARÃES, David Pedroza; DE LIMA, Ana Caroline Gomes; PEDROZA, Diego**. As aves de Tefé na Amazônia central: revisão histórica, compilação de dados e registros relevantes**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais, v. 17, n. 2, p. 379-406, 2022.

HAELEWATERS, Danny. et al. **The power of citizen science to advance fungal conservation**. Conservation Letters, v. 17, e13013, 2024.

HEATLEY, J. Jill; CORNEJO, Juan.Chapter 21 – **Psittaciformes**. In: MILLER, R. Eric; FOWLER, Murray (ed.). Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine. v. 8. St. Louis: W.B. Saunders, 2015.

INSTITUTO Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). C**enso Demográfico 2010: Sinopse.** Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html. Acesso em: 7 ago. 2026.

IMAGENS editadas por IA ameaçam pesquisas sobre aves e preocupam cientistas; entenda. **O Globo**, Rio de Janeiro, 20 jul. 2026. Disponível em: https://oglobo.globo.com/economia/tecnologia/noticia/2026/07/20/imagens-editadas-por-ia-ameacam-pesquisas-sobre-aves-e-preocupam-cientistas-entenda.ghtml. Acesso em: 7 ago. 2026.

IRWIN, Alan. **Citizen science: a study of people, expertise and sustainable development**. London: Routledge.1995.

LATORRES, Alex de M. et al. **Unconventional bird predators are relevant to vertebrate trophic relationships? A community science platform helps to answer this question.** Food Webs, v. 31, p. e00232, 2022.

MARCELIANO, Maria Luiza Videira; MARTINS, Antônio Carlos Seabra. **Aves da Amazônia**. Biologia para Biólogos, 2018.

MARINI, Miguel Angelo; GARCIA, Frederico I. Conservação de aves no Brasil. Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 95-102, 2005.

MORAIS, Larissa; CONCEIÇÃO, Gonçalo; NASCIMENTO, Janilde. **Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica**. Agrarian Academy, v. 1, n. 01, 2014.

MOREIRA, Victor de Paiva. **Frugivoria em Myrteae (Myrtaceae) nas Américas.** 2024. Dissertação de Mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

PAULA, Marcella Rosa Rossoni de; MUCELIN, Carlos Alberto; CAVARZERE, Vagner. **Distribuição das Espécies de Aves Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná de Acordo com a Ciência Cidadã.** Biodiversidade Brasileira – BioBrasil, n. 2, 2022.

PIZO, Marco Aurélio. **The relative contribution of fruits and arthropods to the diet of three trogon species (Aves, Trogonidae) in the Brazilian Atlantic Forest.** Revista Brasileira de Zoologia, v. 24, n. 2, p. 515-517, 2007.

PONTES, Ana Paula Stedille et al. A**nálise bibliométrica da produção científica sobre a jabuticabeira (Plinia sp.).** 2023. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SANTOS, F. R.; SANTOS, M. J. C. **O uso de plantas medicinais mantidas em sistemas agroflorestais no âmbito da agricultura familiar.** Scientia Plena, v. 8, n. 4 (b), 2012.

SILVA, Marcella Fortes Falcão da. **Comportamento de forrageamento de Surucuá-variado (Trogon Surrucura)(Aves, Trogonidae).** 2015.

SOARES, Lariessa Moura de Araújo; CAVALI, Jucilene; VITULE, Jean Ricardo Simões; DORIA, Carolina Rodrigues da Costa. C**iência cidadã como forma de identificação de ocorrência de espécies não nativas na Amazônia.** SAJEBTT, Rio Branco, v. 7, n. 2, p. 145–159. 2020.

STAGGEMEIER, Vanessa Graziele et al. **Padroes reprodutivos em Myrtaceae: uma abordagem ecologica e filogenetica.** 2008. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista" Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências (Campus de Rio Claro).

TUBELIS, Dárius Pukenis; MENDONÇA, Luiz Gonzaga Alves. **Ciência-cidadã e suas potencialidades na contribuição ao conhecimento e estudo das aves brasileiras: uma síntese.** REVISTA FOCO, v. 16, n. 12, p. e4001-e4001, 2023.

WIKIAVES. **Retrospectiva 2009**. [S. l.], 2009. Disponível em: https://www.wikiaves.com.br/wiki/wikiaves:2009:retrospectiva. Acesso em: 7 ago. 2026.

Anexos



Figura 1. Agrupamento de registros fotográficos de aves alimentando-se de frutos de Myrtaceae encontrados na plataforma WikiAves.



Tabela 1. Agrupamento de dados validados de frugivoria de 13 espécies de Myrtaceae em estudo, comparando o número total de espécies de aves oriundos de ciência cidadã e da literatura



Tabela 2. Comparativo da composição das interações entre spp. de aves e plantas registradas por meio da abordagem de campo (lacuna azul) e a abordagem de ciência cidadã (lacuna amarela). Interações registradas em ambas as abordagens (lacunas verdes).



Figura 2. Tendência temporal dos registros de frugivoria em espécies de Myrtaceae, obtidos na plataforma WikiAves, agrupado em triênios no período de 2005 a 2026.



Figura 3. Distribuição espacial dos registros de frugivoria em espécies de Myrtaceae obtidos na plataforma WikiAves na região Neotropical (2005-2026).



Figura 4. Diagrama de Venn comparando as interações únicas entre espécies de aves e espécies de plantas registradas pela literatura e pela plataforma WikiAves, evidenciando as interações exclusivas de cada abordagem e as comuns a ambas.

CÓDIGO: SB1657

AUTOR: DANIEL MENDONCA DA SILVA

ORIENTADOR: LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ LIMA

TÍTULO: Análise da influência da proteína XPC na via de sinalização Wnt em fibroblastos sob estresse oxidativo

Resumo

A proteína XPC é conhecida por seu papel central na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). No entanto, evidências recentes sugerem que suas funções se estendem além do reparo do DNA, influenciando também outros processos celulares. Neste estudo, comparamos fibroblastos humanos proficientes e deficientes em XPC sob estresse oxidativo para identificar genes e vias afetados pela perda de XPC. A deficiência de XPC está associada à regulação negativa de genes ribossomais, nucleares e mitocondriais, sugerindo biogênese e montagem de ribossomos prejudicadas durante o estresse. Ao mesmo tempo, um subconjunto de genes foi regulado positivamente, sugerindo respostas compensatórias. Esses achados corroboram dados transcriptômicos anteriores e ressaltam o papel mais amplo da XPC na manutenção da homeostase celular. Este estudo revela as diferenças transcricionais entre fibroblastos proficientes e deficientes em XPC, enfatizando seu papel multifacetado na regulação celular.

Palavras-chave: Reparo de DNA; XPC; Xeroderma pigmentosun; Estresse oxidativo; Biogêne

TITLE: Role of the XPC Protein in Modulating Ribosomal Biogenesis and Cellular Signaling under Oxidative Stress in Human Fibroblasts

Abstract

The XPC protein is known for its central role in the nucleotide excision repair (NER) pathway. However, recent evidence suggests that its functions extend beyond DNA repair, influencing other cellular processes as well. In this study, we compared XPC-proficient and XPC-deficient human fibroblasts under oxidative stress to identify genes and pathways affected by XPC loss. XPC deficiency is associated with downregulation of ribosomal, nuclear, and mitochondrial genes, suggesting impaired ribosome biogenesis and assembly during stress. At the same time, a subset of genes was upregulated, suggesting compensatory responses. These findings corroborate previous transcriptomic data and underscore the broader role of XPC in maintaining cellular homeostasis. This study reveals the transcriptional differences between XPC-proficient and -deficient fibroblasts, emphasizing its multifaceted role in cellular regulation.

Keywords: DNA repair; XPC; Xeroderma pigmentosun; Oxidative stress; Ribosomal bi

Introdução

O genoma humano é constantemente exposto a agentes exógenos, como a radiação ultravioleta (UV), e endógenos, como o estresse oxidativo. Estima-se que cada célula sofra dezenas de milhares de lesões de DNA por dia. Se não forem reparadas, podem resultar em mutações capazes de comprometer a viabilidade celular e do organismo (Hoeijmakers et al., 2009; Jackson et al., 2009). O estresse oxidativo é provocado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (•OH), oxigênio singlete ($^1O_2$) e radicais superóxido ($O_2•−$). Essas espécies participam de processos biológicos, como fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição, apoptose, imunidade e diferenciação. Entretanto, quando excedem a capacidade antioxidante, geram danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. No DNA, atacam preferencialmente guaninas, formando a lesão 7,8-dihidro-8-oxodeoxiguanina (8-oxoG), associada à progressão de várias doenças (Pizzino et al., 2017). A persistência de danos no DNA pode promover mutagênese e carcinogênese. Para evitá-los, células de mamíferos dispõem de vias de reparo especializadas. A via de excisão de bases (BER) remove modificações de bases e sítios abásicos, enquanto a via de excisão de nucleotídeos (NER) elimina lesões volumosas, como dímeros de pirimidina, que distorcem a dupla-hélice. A NER divide-se em duas subvias: Global Genome-NER (GG-NER), iniciada pela proteína XPC, e Transcription Coupled-NER (TC-NER), iniciada por CSB. Embora a BER seja a principal via de remoção de bases oxidadas, há evidências de cooperação entre proteínas da NER e da BER no reparo de lesões oxidativas (D'Errico et al., 2006; Melo et al., 2016; Pascucci et al., 2011). O xeroderma pigmentosum (XP) resulta de mutações em genes da NER (XPA–XPG, XPV). Trata-se de doença autossômica recessiva, caracterizada por elevada suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores cutâneos e, em alguns casos, neurodegeneração. Em 1968, Cleaver demonstrou que a ausência de XPC está associada à doença, reforçando o papel da proteína na reparação do DNA. Além do reparo, proteínas da NER atuam em funções não canônicas, como regulação transcricional, inclusive em promotores sem dano detectável (Apostolou et al., 2019; Le May et al., 2010). XPC participa de um complexo com Oct4, Sox2 e Nanog, fatores essenciais para a pluripotência, controlando genes críticos no desenvolvimento embrionário (Fong et al., 2011; Cattoglio et al., 2015). Em trabalhos anteriores de nosso grupo (Melo, 2014; Melo et al., 2016) mostraram que fibroblastos deficientes em XPC apresentam resistência ao estresse oxidativo, diferindo de células deficientes em XPA ou CSB, sensíveis a agentes oxidantes. Observamos ainda acúmulo de danos no DNA e redução da atividade de APE1 e OGG1, enzimas da BER. Ensaios de coimunoprecipitação revelaram interação entre XPC e APE1, sugerindo cooperação direta entre as vias. Assim, a resistência das células deficientes, mesmo com falhas em NER e BER, levanta a hipótese de mecanismos compensatórios. Notavelmente, pacientes XPC exibem fenótipos mais brandos, como ausência de neurodegeneração, em contraste com outros grupos de complementação. O presente trabalho dá continuidade a essas investigações, comparando fibroblastos proficientes e deficientes em XPC quanto à expressão de mRNAs e proteínas associadas à biogênese ribossomal e à sinalização celular em condições basais e sob estresse oxidativo. Esse estudo busca elucidar os processos

endógenos modulados por XPC, compreender os fenótipos associados à sua deficiência e explicar diferenças em relação a outras proteínas da via NER.

Metodologia

Cultura de células A cultura de células se dará com fibroblastos humanos imortalizados por SV-40: fibroblastos proficientes em XPC (XP4PA/XPC) e fibroblastos deficientes em XPC (XP4PA). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino) e 1% de antibiótico, em frascos próprios para cultivo celular. Plaqueamento de células e indução do estresse oxidativo O tratamento de estresse oxidativo se fará com a introdução de H2O2 nas linhagens de fibroblastos proficientes e deficientes em XPC, visando avaliar o padrão de expressão gênica dessas células. Para a indução do estresse oxidativo com H2O2 será feito o plaqueamento de 106 células em placas de Petri de 100 mm e para as células se aderirem, será necessário o cultivo por 24 h. Em seguida, serão incubadas com meio de cultura contendo 500 µM H2O2, por 20 minutos e depois lavadas com PBS. Extração de DNA, RNA e proteínas A partir das células tratadas e não tratadas serão feitas extrações de DNA, RNA e proteínas. O RNA total dos diferentes tratamentos celulares será extraído com o Kit illustra triplePrep (GE Healthcare) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Análise da expressão gênica por RT-qPCR Para a análise por qPCR em tempo real, O RNA extraído na etapa anterior será tratado com DNAse antes de ser utilizado no Kit High-Capacity cDNA Reverse Trascription (Applied Biosystems) e seguirá o protocolo fornecido pelo fabricante. A análise da expressão gênica será realizada por meio da metodologia de qPCR em tempo real usando o SybrGreen PCR Master Mix, que necessitará dos primers. Os primers RPS6KC1, RPL27, RPL36, RPL35, RPL27A, RPL22, RPS11, RPL18, RPS19, RARG, ELK1, 47S, 28S, 18S, MRPL10, MRPS11, MRPS27, GSK3B, CCND1, DDX3X, SFRP1, PKD2, DKK3, MACF1, MARK2, APC, WNT5A, DDB1, mTOR, ROCK1, serão utilizados para a análise da biogênese ribossomal e sinalização celular e os mesmos serão obtidos no site da Thermo Fisher e a Exxtend. Determinação do perfil protéico por Western-blot Para ter uma noção semi-quantitativa da expressão de proteínas, será realizada a extração das proteínas solúveis totais seguindo a metodologia descrita acima no ponto 3.3 e a análise pelo Western-blot (TOWBIN, H., STAEHELIN, T., & GORDON, 1979). Para a realizar a metodologia, será feito um gel de eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; WEBER; OSBORN, 1969) para separar as proteínas por massa molecular e obtendo-se um perfil de expressão. Em seguida, será feita a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e logo após a incubação da membrana com os anticorpos específicos para produto protéico dos genes selecionados pela análise de bioinformática. A incubação finalizada, a revelação da reação antígeno-anticorpo será usando a solução de revelação Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad). Para o controle constitutivo de expressão das proteínas, será usado a β-actina. Será investigada a proteína XPC, para elucidar o estado da biogênese ribossomal das células proficientes e deficientes em XPC tratadas ou não com H2O2. Ensaio de Co-imunoprecipitação (Co-IP) Para esclarecer as possíveis interações entre a proteína XPC e proteínas relacionadas à sinalização celular. Previamente, 1 x 10^6 células serão plaqueadas em placas de Petri de 10 cm e incubadas por 24 horas, à 37 C. Em seguida, as células serão lavadas com PBS e incubadas com formaldeído 1% durante 5 minutos, a reação então inibida após a adição da glicina 1M e as células serão lavadas com PBS gelado, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos à 4 C, e incubadas com o tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl

150 mM, SDS 0,1 %) em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. O volume total dos lisados será fracionado, para o input e o restante dos anticorpos, dividido entre o anti-IgG e os anticorpos de interesse. Após 24 horas da incubação com os anticorpos, os lisados serão então incubados com beads, durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, será realizada a lavagem dos beads com tampão de diluição (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton 0,2 %). Logo após a última lavagem, adicione o tampão Laemmli 5X (Tris 62,5 mM pH 6,8, Glicerol 20%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0,01%, β-mercaptoetanol 5%) aos beads e aqueça por 10 minutos à 90°C. Os imunoprecipitados serão analisados através da técnica de western blotting, como descrito no tópico 3.5.

Resultados e Discussões

Resultados Ao realizarmos uma análise de transcriptoma de fibroblastos humanos proficientes e deficientes em XPC, tratados e não tratados com H2O2, conseguimos identificar e selecionar genes relacionados à biogênese ribossomal e sinalização celular que apresentaram mudanças de expressão. A validação dos resultados por RT-qPCR demonstrou que a deficiência em XPC afetou a transcrição de genes dessa via durante o estresse oxidativo (Figura 1). Foi observada uma redução significativa na expressão dos genes RPS6KC1, RPL27, RPL36, RPL35, RPL27A, RPL22, RPS11, RPL18 e RPS19 em células deficientes em XPC, quando comparada às células proficientes. Os genes RPL27 e RPL35 exibiram as reduções mais acentuadas ($p < 0,001$). Em contrapartida, o genes RRS1 apresentou aumento da expressão nas células deficientes em XPC sob estresse oxidativo. Análises de rede no Cytoscape identificaram RARG e ELK1 como fatores de transcrição com múltiplas conexões a genes ribossomais (Figura 2). A expressão de RARG e ELK1 esteve reduzida nas células deficientes em XPC (Figura 3). Com relação aos transcritos de rRNA, verificou-se uma diminuição significativa de precursor 47S em células proficientes em XPC após o estresse oxidativo. Os transcritos derivados 28S e 18S apresentaram redução tanto em células proficientes quanto em deficientes em XPC. MRPL10 e MRPS11 mostraram redução da expressão em células deficientes em XPC após o tratamento com H2O2, enquanto MRPS27 apresentou alterações na expressão gênica em ambas as linhagens analisadas sob estresse oxidativo (Figura 5). Entre os genes de sinalização avaliados, ATM apresentou redução de expressão em ambas as linhagens, sendo o efeito mais evidente após a exposição ao H_2O_2. Já ATR demonstrou tendência à redução em células deficientes em XPC. Discussão Os principais achados deste estudo indicam que a deficiência em XPC está associada à regulação negativa de genes relacionados à biogênese ribossomal e à sinalização celular sob estresse oxidativo. Os dados demonstram que a ausência de XPC afeta a transcrição de subunidade ribossomais nucleares e mitocondriais, alterando a dinâmica do processamento de pré-rRNA e modula a expressão de fatores-chaves como ELK1 e RRS1. Em conjunto, essas evidências sugerem um papel pleiotrópico e não-canônico da XPC na manutenção da homeostase transcricional e nucleolar, indo além de sua função clássica no reparo por excisão de nucleotídeos (NER). A redução coordenada na expressão de múltiplos genes de proteínas ribossomais nucleares (RPL27, RPL35, RPS6KC1 e outras) em células XPC-deficientes sob estresse oxidativo sugere uma falha na manutenção da maquinaria transcricional. Corroborando o papel de XPC como coativador transcricional que recruta complexos remodeladores, como o ATAC, para promover a acetilação de H3K9 em promotores ativos (Bidon et al., 2018), nossos resultados indicam que a ausência de XPC compromete a iniciação transcricional

destes genes. A repressão observada não parece ser apenas uma resposta adaptativa passiva ao estresse, mas sim uma consequência direta da incapacidade de remodelar a cromatina e sustentar a transcrição sem a função coativadora de XPC. A identificação de ELK1 como um "hub" central na rede de genes ribossomais reprimidos corrobora achados de que ELK1 coordena componentes da maquinaria de expressão gênica (Boros et al., 2009). Enquanto Boros et al. descrevem esse papel em condições basais, Shi et al. (2014) demonstram a ativação sequencial de ELK1 sob estresse para induzir checkpoints. Os dados atuais mostram uma redução transcricional do ELK1 na deficiência de XPC. Assim sugerimos que essa repressão é mediada pelo eixo XPC-APE1/Ref-1, como o promotor de ELK1 é rico em ilhas CpG e depende de desmetilação ativa da via BER, a ausência de XPC impede a abertura da cromatina, silenciando ELK1 e, consequentemente, bloqueando o processamento dos rRNA. Assim, sem a XPC, a célula pode perder a capacidade de modular a resposta de ELK1, resultando em um colapso desregulado da biogênese ribossomal. A respeito da transcrição de rDNA, observamos um acúmulo basal e desregulado de transcritos precursores de rRNA (47S) nas células deficientes em XPC sob estresse, em contraste com a diminuição vista em células proficientes. Essa divergência contrasta também com o observado por Taupelet et al (2022) para a proteína XPG, cuja deficiência leva ao acúmulo de 47S. Nossos dados sugerem que XPC atua na regulação da iniciação transcricional e no "freio metabólico" nucleolar. A ausência de XPC pode levar ao aprisionamento espacial da RNA polimerase I na periferia nucleolar, impedindo a desativação dos fatores SL1/UBF e gerando uma síntese de 47S que são consegue ser madura devido à carência de proteínas ribossomais reguladas por ELK1. Outro ponto importante é o gene regulador RRS1, que apresentou expressão aumentada nas células XPC-deficiente sob estresse. cerezo et al. (2025) destacam que RRS1 é crucial para estabilidade nucleolar, e Gnanasundram e Fahraeus (2018) descrevem como o estresse de tradução retroalimenta vias de proliferação integrando esse achados à literatura recente (Cao et al., 2021; Song et al., 2018), sugerimos que o aumento de RRS1 não representa uma tentativa de biogênese, mas sim um mecanismo compensatório de evasão da apoptose. O estresse nucleolar crônico em células XPC-deficientes liberaria proteínas ribossomais (como RPL11) para inibir a MDM2 e estabilizar a p53. No entanto, a superexpressão de RRS1 atua sequestrando ativamente a RLP11 no nucléolo. Ao reter a RPL11, a MDM2 permanece livre para degradar a p53 por ubiquitinação, diminuindo o sinal de alerta celular. Adicionalmente, a desregulação estende-se aos genes de tradução mitocondrial (MRPL10 e MRPS11) e à interface como a estabilidade genômica. A falha na biogênese ribossomal e o acúmulo de pré-rRNA 47S são gatilhos conhecidos para formação de híbridos RNA-DNA (R-loops) no locus do rDNA. Como o processamento e a clivagem desses R-loops nucleolares dependem de fatores da via NER, incluindo a XPC (Takashima et al., 2025), a ausencia desta proteína pode levar ao aprisionamento de R-loops no núcleo, gerando instabilidade genômica crônica. É importante notar que as análise foram restritas ao nível de mRNA. Como detalhado na revisão de Shcherbik e Pestov (2019), o estresse oxidativo induz modificações pós-transcricionais extensas nos ribossomos que alteram a função traducional independentemente dos níveis de transcrição. Portanto, a ausência de validação proteica limita a conclusão sobre se as alterações transcriptômicas se refletem funcionalmente nos níveis de proteínas. É plausível que, mesmo com mRNA reduzido, os ribossomos remanescentes estejam funcionando comprometidos por dano oxidativo direto. Essa limitação pode ter superestimado o impacto funcional observado, caso ocorram mecanismos compensatórios de tradução que mantenham a homeostase proteica apesar da queda no mRNA. Este estudo fornece evidências transcriptômicas de que a XPC

desempenha um papel regulatório na biogênese ribossomal e na homeostase nucleolar sob estresse oxidativo. Ao atuar na modulação de fatores como ELK1, na retenção espacial da RNA Pol I e na regulação de checkpoint de estresse nucleolar via RRS1, a XPC demonstra funções além daquela que já conhecemos. Embora a validação proteica seja necessária para confirmar o impacto funcional, esses dados expandem o entendimento das funções não-canônicas da XPC além do reparo de DNA. Estudos futuros deverão investigar se essa regulação transcricional impacta diretamente a sobrevivência celular e a senescência, consolidando a proteína XPC como um nó central na resposta ao estresse.

Conclusão

Os dados apresentados fornecem evidências de que a proteína XPC desempenha um papel importante na regulação da biogênese ribossomal e pode ter influência na sinalização celular. A ausência de XPC está associada à redução da expressão de genes ribossomais nucleares e mitocondriais, bem como de fatores de transcrição relacionados. Embora alguns experimentos, como Western blot, não tenham sido concluídos, os dados apresentados apontam para uma possível ligação entre XPC e os genes da biogênese ribossomal e sinalização celular. Experimentos adicionais são necessários para confirmar esses observações e aprofundar o entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos

Referências

APOSTOLOU, Z. et al. Nucleotide Excision Repair and Transcription-Associated Genome Instability. BioEssays, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 1–12, 2019. Available at: https://doi.org/10.1002/bies.201800201 Bidon, B., Iltis, I., Semer, M. et al. XPC is an RNA polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1. Nat Commun 9, 2610 (2018). https://doi.org/10.1038/s41467-018-05010-0 Boros J, Donaldson IJ, O'Donnell A, Odrowaz ZA, Zeef L, Lupien M, Meyer CA, Liu XS, Brown M, Sharrocks AD. Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery. Genome Res. 2009 Nov;19(11):1963-73. doi: 10.1101/gr.093047.109. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. Mol Cell. 2010 Oct 22;40(2):216-27. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.024. PMID: 20965417; PMCID: PMC2987465. Cao P, Yang A, Li P, Xia X, Han Y, Zhou G, Wang R, Yang F, Li Y, Zhang Y, Cui Y, Ji H, Lu L, He F, Zhou G. Genomic gain of RRS1 promotes hepatocellular carcinoma through reducing the RPL11-MDM2-p53 signaling. Sci Adv. 2021 Aug 25;7(35):eabf4304. doi: 10.1126/sciadv.abf4304. PMID: 34433556; PMCID: PMC8386927. CATTOGLIO, C. et al. Functional and mechanistic studies of XPC DNA-repair complex as transcriptional coactivator in embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 112, n. 18, p. E2317–E2326, 2015. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1505569112 D'ERRICO, M. et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. The EMBO Journal, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 4305–4315, 2006. DE MELO, J. T. A. Papel da Proteína de Reparo Xpc na Regulação das Proteínas de Reparo APE1, OGG1 e PARP-1 em Células Humanas e

de Camundongos. 1–188 f. 2014. - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [s. l.], 2014. DE MELO, J. T. A. et al. XPC deficiency is related to APE1 and OGG1 expression and function. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, [s. l.], v. 784–785, p. 25–33, 2016. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.01.004 FONG, Y. W. et al. A DNA Repair Complex Functions as an Oct4/Sox2 Coactivator in Embryonic Stem Cells. National Institute of Health, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 120–131, 2011. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.038.A HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. New England Journal of Medicine, v. 361, n. 15, 2009. JACKSON SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009 Oct 22;461(7267):1071-8. doi: 10.1038/nature08467. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, [s. l.], v. 227, p. 680–685, 1970. Available at: http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/ LE MAY, N. et al. NER Factors Are Recruited to Active Promoters and Facilitate Chromatin Modification for Transcription in the Absence of Exogenous Genotoxic Attack. Molecular Cell, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 54–66, 2010. Lindström, M.S. The Central Role of Ribosomal Proteins in p53 Regulation. Cancers 2025, 17, 1597. https://doi.org/10.3390/cancers17101597 PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, [s. l.], v. 2017, 2017. Available at: https://doi.org/10.1155/2017/8416763 Sharifi S, Bierhoff H. Regulation of RNA Polymerase I Transcription in Development, Disease, and Aging. Annu Rev Biochem. 2018 Jun 20;87:51-73. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012612. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29589958. Shcherbik, N.; Pestov, D.G. The Impact of Oxidative Stress on Ribosomes: From Injury to Regulation. Cells 2019, 8, 1379. https://doi.org/10.3390/cells8111379 Shi Q, Sutariya V, Bishayee A, Bhatia D. Sequential activation of Elk-1/Egr-1/GADD45α by arsenic. Oncotarget. 2014 Jun 15;5(11):3862-70. doi: 10.18632/oncotarget.1995. Song J, Ma Z, Hua Y, Xu J, Li N, Ju C, Hou L. Functional role of RRS1 in breast cancer cell proliferation. J Cell Mol Med. 2018 Dec;22(12):6304-6313. doi: 10.1111/jcmm.13922. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30320499; PMCID: PMC6237566. Ken Takashima, Yohana Mtali, Akter Suraiya et al. Nucleolar stress generates ribosomal DNA–derived RNA–DNA hybrids that prime innate immunity, 16 October 2025, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7795572/v1] TAUPELET F, DONNIO L-M, MAGNANI C, MARI P-O, GIGLIA-MARI G (2022) A stable XPG protein is required for proper ribosome biogenesis: Insights on the phenotype of combinate Xeroderma Pigmentosum/Cockayne Syndrome patients. PLoS ONE 17(7): e0271246. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271246 TOWBIN, H., STAEHELIN, T., & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, [s. l.], v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350 Vadivel Gnanasundram S, Fåhraeus R. Translation Stress Regulates Ribosome Synthesis and Cell Proliferation. Int J Mol Sci. 2018 Nov 27;19(12):3757. doi: 10.3390/ijms19123757. WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Biological Chemistry, [s. l.], v. 244, n. 16, p. 4406–4412, 1969. Available at: https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)94333-4 Yan S, Sorrell M, Berman Z. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. Cell Mol Life Sci. 2014 Oct;71(20):3951-67. doi:

10.1007/s00018-014-1666-4. Mansilla, Francisco, Lamy, Philippe, Ørntoft, Torben F., Birkenkamp-Demtröder, Karin, Genes Involved in Human Ribosome Biogenesis are Transcriptionally Upregulated in Colorectal Cancer, Scholarly Research Exchange, 2009, 657042, 5 pages, 2009. https://doi.org/10.3814/2009/657042

CÓDIGO: SB1660

AUTOR: PEDRO FERNANDEZ GUEDES

COAUTOR: CLAUDE LUIZ DE AGUILAR SANTOS

ORIENTADOR: ALINE MARCELE GHILARDI

TÍTULO: Diversidade paleoicnológica da Formação Açu

Resumo

Registros de interações, como traços de mordida em ossos fossilizados, fornecem evidências sobre comportamento e dinâmica ecológica de comunidades extintas. A Formação Açu, parte da Bacia Potiguar, representa a transição entre o Cretáceo Inferior e Superior e é dividida em quatro subunidades. Este estudo analisa o osso longo de saurópode MCC-3249, da Subunidade Açu 4, no Ceará, depositado no Museu Câmara Cascudo, de estratos interpretados como paleoambiente flúvio-deltaico. Três conjuntos de traços foram identificados na diáfise e epífise distal, fotografados e medidos no ImageJ v.1.54g. Os traços são semicirculares a elípticos, com 7–16 mm de diâmetro, orientação longitudinal e sem atravessar o córtex. Sua morfologia é compatível com Nihilichnus clavus, caracterizada por perfurações ósseas elípticas ou circulares, não penetrantes, com concavidades cônicas ou semiesféricas. Nihilichnus está associado à predação ou necrofagia. O registro fóssil da Açu 4 inclui peixes, Peirosauridae e Theropoda não-avianos. Embora terópodes não possam ser descartados, a morfologia e ausência de marcas de serrilha são mais compatíveis com mordidas de Crocodylomorpha de grande porte. Suas dimensões não correspondem a Peirosauridae. Possíveis icnoprodutores incluem grandes Notosuchia, incluindo Peirosauridae, ou Neosuchia, como Pholidosauridae. Esses traços contribuem para compreender as interações tróficas do Cretáceo, indicando predação ou necrofagia de saurópodes por Crocodylomorpha em Açu 4

Palavras-chave: Bioerosões, Traço Fóssil, Sauropoda, Taphonomia, Crocodylomorpha

TITLE: Paleoichnological Diversity of the Açu Formation

Abstract

Biological interaction records, such as bite traces on fossil bones, provide evidence of behavior and ecological dynamics in extinct communities. The Açu Formation, part of

the Potiguar Basin, represents the transition from the Early to Late Cretaceous and has four subunits. This study analyzes sauropod long bone MCC-3249 from the Açu 4 Subunit, Ceará, deposited at the Câmara Cascudo Museum, from strata interpreted as a fluvio-deltaic paleoenvironment. Three sets of bite traces were identified on the diaphysis and distal epiphysis, photographed and measured with ImageJ v.1.54g. The traces are semicircular to elliptical, 7–16 mm in diameter, longitudinally oriented, and do not penetrate the cortex. Their morphology is consistent with the ichnospecies Nihilichnus clavus, characterized by elliptical to circular, non-penetrating bone perforations with conical or hemispherical concavities. Nihilichnus is associated with predatory or scavenging feeding behavior. The Açu 4 fossil record includes fish, Peirosauridae, and non-avian Theropoda. Although theropods cannot be ruled out, their morphology and lack of serration marks better fit bites from large Crocodylomorpha. Their dimensions do not match Peirosauridae. Possible producers include large Notosuchia, including Peirosauridae, or Neosuchia, such as Pholidosauridae. These traces help explain Cretaceous trophic interactions, indicating sauropod predation or scavenging by Crocodylomorpha in the Açu 4 paleoecosystem.

Keywords: Bioerosion, Trace Fossils, Sauropoda, Taphonomy, Crocodylomorpha

Introdução

Ao estudarmos os icnofósseis temos acesso a mais informações que os somatofósseis não nos revelam, como, por exemplo, certos comportamentos de organismos do passado, grupos que não são facilmente preservados no registro fossilífero ou que ainda não foram descritos para certas localidades e detalhes que não são facilmente fossilizados. Esses vestígios, de origem biogênica, são conhecidos como icnofósseis (Ekdale et al., 1984).

As bioerosões são o resultado da interação de organismos com o substrato já consolidado, como rochas, conchas, madeira e ossos (Neumann, 1966). Podem ser produzidas por vertebrados ou invertebrados e refletir diferentes comportamentos, como pastagem, fixação, predação, pupação, entre outros (Neumann, 1966; Bromley, 1994; Whisshak e Tapanila, 2008; Tribollet et al., 2011). Por isso, a análise de bioerosões em ossos fósseis tem se mostrado uma ferramenta importante para interpretações paleoecológicas e tafonômicas (Höpner & Bertling, 2017; Serrano-Brañas et al., 2018; Ozeki et al., 2020; Benyoucef & Bouchemla, 2023).

Traços de mordida em ossos fossilizados são particularmente relevantes porque normalmente registram interações alimentares (Haynes, 1980, 1982, 1983; Bown e Kraus, 1981) e podem servir como marcadores tafonômicos (Mikuláš et al., 2006). Esses traços podem estar associados à predação, necrofagia ou manipulação pós-morte de restos esqueléticos (Mikuláš et al., 2006; Hunt & Lucas 2025). Sua morfologia varia conforme a anatomia dentária do icnoprodutor, a intensidade da mordida, a orientação do contato, o tipo de tecido ósseo afetado e o estágio tafonômico da carcaça no momento da interação. Perfurações, sulcos, ranhuras, fraturas marginais e áreas de

esmagamento podem, portanto, auxiliar na identificação do possível grupo produtor (Njau & Blumenschine 2006; Schwimmer, 2010; LaBarge & Njau 2024).

Na Formação Açu, Bacia Potiguar, registros de dinossauros, crocodyliformes e outros organismos têm ampliado significativamente o conhecimento sobre os ecossistemas continentais do Nordeste brasileiro durante o Albiano–Cenomaniano. Embora bioerosões em ossos por invertebrados já tenham sido reportadas para essa unidade (Belfort et al., 2026), ainda há uma diversidade de traços não descrita e estudos icnológicos detalhados podem ajudar a identificar possíveis produtores e implicações ecológicas e tafonômicas.

Este trabalho descreve traços de mordidas preservados em um osso longo de um dinossauro saurópode da Formação Açu (Albiano-Cenomaniano) da Bacia Potiguar. Os objetivos foram caracterizar morfologicamente os traços, discutir sua atribuição icnotaxonômica, avaliar possíveis icnoprodutores e interpretar suas implicações tafonômicas. Os resultados obtidos ampliam o entendimento sobre a diversidade icnológica da unidade e contribuem para a compreensão de relações ecológicas durante o Cretáceo no Gondwana.

Metodologia

CONTEXTO GEOLÓGICO

A Bacia Potiguar está localizada no extremo leste da Margem Equatorial Brasileira e inclui áreas emersas e submersas. A maior parte da porção emersa situa-se no estado do Rio Grande do Norte, com exposições em menor dimensão no Ceará. A bacia abrange aproximadamente 48.000 km², dos quais cerca de 45% (21.500 km²) correspondem à área emersa e 55% (26.500 km²) à porção submersa (Pessoa-Neto, 2007).

A Formação Açu integra a sucessão albiana-cenomaniana da Bacia Potiguar (Pessoa-Neto, 2007; Maraschin et al., 2010), e é tradicionalmente interpretada como formada por depósitos continentais costeiros associados a sistemas fluviais, deltaicos e estuarinos anteriores à instalação dos depósitos carbonáticos da Formação Jandaíra (Araripe e Feijó, 1994). A unidade é dividida em quatro subunidades, denominadas Açu I a Açu IV (Vasconcelos et al., 1990).O espécime analisado neste estudo provém de afloramentos da Subunidade Açu-IV, nas proximidades do município de Quixeré, Ceará, Nordeste do Brasil.

A Formação Açu apresenta um registro paleontológico diversificado, incluindo fósseis de vegetais (Mussa et al., 1984), palinomorfos (Dino e Lima, 1991), dinoflagelados (Dino e Lima, 1985), moluscos (Duarte e Santos R.S., 1962; Oliveira, 2013), crustáceos (Duarte e Santos R.S., 1962), anelídeos (Dino e Lima, 1991), peixes (Duarte e Santos R.S., 1962; Brito et al., 2025; Veiga et al., 2019), Crocodyliformes (Ribeiro et al., 2019; Albuquerque et al., 2025) e dinossauros (Pereira et al., 2018, 2019, 2020, 2024; Leonardi et al., 2020; Pereira et al., 2020; Rocha et al., 2025).

Entre os dinossauros, há registros de Sauropoda Titanosauriformes e Rebbachisauridae, além de Ornithopoda e diferentes grupos de Theropoda, incluindo Charcarodontosauria, Megaraptora, Maniraptora, Abelisauridae, Noasauridae e Spinosauridae. O único gênero e espécie de dinossauro descrito formalmente para a unidade até o momento é o titanossauro Tiamat valdecii Pereira et al. (2024), representado por vértebras caudais. Entre os Crocodyliformes tem-se registros de dentes atribuídos a Peirosauridae, Itasuchidae, Candiodontidae e Sphagesauria.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O material analisado corresponde a um osso longo apendicular proximal (estilopódio) atribuído a Sauropoda indeterminado, fraturado em 3 partes diferentes, as quais cada uma mede 405 mm, 251 mm e 400 mm, depositado no Setor de Paleontologia do Museu Câmara Cascudo (MCC), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob o código de registro MCC 3249. O espécime foi coletado em 2004 pelo Professor Dr. Francisco Pinheiro de Lima Filho, durante atividades de campo da disciplina de Mapeamento de Terrenos Sedimentares, do curso de Graduação em Geologia da UFRN, em estratos da Subunidade Açu IV.

Os traços descritos neste estudo ocorrem na superfície do espécime e foram numerados como BT-01 a BT-10. A sigla BT é usada aqui de forma operacional para indicar “bite trace”.

Descrição e comparação icnológica

A descrição dos traços foi baseada em atributos morfológicos relevantes para a icnotaxonomia de bioerosões em ossos, incluindo contorno, dimensões, profundidade relativa, organização espacial, presença ou ausência de estrias, bordas irregulares, deformação marginal e associação entre marcas (Pirrone et al., 2014). A interpretação icnotaxonômica considerou revisões recentes de traços de bioerosão (Wisshak et al., 2019) e comparações com outros traços de mordida descritos na literatura (e.g., Mikula´s et al., 2006; Njau e Blumenschine, 2006; Trifilio et al., 2013; LaBarge e Njau, 2024).

Para a aquisição de imagens foram utilizados uma câmera Canon EOS Rebel T7 e um iPhone 13. As medidas lineares dos traços foram obtidas por meio do software ImageJ v1.54 (Rasband, Wayne, 1987). As dimensões são apresentadas em milímetros.

Resultados e Discussões

SISTEMÁTICA ICNOLÓGICA

Nihilichnus Mikuláš et al., 2006

Nihilichnus clavus LaBarge e Njau, 2024

Espécimes referidos. BT-2 a BT-09, preservados no espécime MCC 3249.

Nihilichnus sicarius LaBarge e Njau, 2024

Espécimes referidos. BT-1, BT-02 e BT-10, preservados no espécime MCC 3249.

(Fig. 1)

Descrição. Dez depressões circulares a semicirculares, sendo algumas aproximadamente triangulares ou lenticulares, preservadas na superfície do espécime MCC 3249. Os traços são pouco profundos, nunca ultrapassando o osso cortical, e estão organizados em três conjuntos principais.

O Conjunto 1 (Fig. C-1), localizado anteromedialmente, próximo à epífise distal do osso, é composto por duas pontuações (pits) rasas, uma lenticular (BT-01) e outra aproximadamente triangular (BT-02), medindo 8 por 10 mm e 9 por 9 mm, respectivamente. Ambas apresentam bordas irregulares, e o contorno dos traços possui dois vértices opostos. É possível observar deformação marginal em BT-02. A distância entre BT-01 e BT-02 possui 18mm.

O Conjunto 2 (Fig. C-2) está localizado na diáfise do osso, e é formado por uma associação de 6 pontuações circulares a semicirculares alinhadas, rasas a muito rasas. Elas possuem bordas regulares e têm no mínimo 7 mm e no máximo 11 mm de diâmetro. A distancia entre BT-03 e BT-04 tendo 8 mm, entre BT-04 e BT-05 com 9 mm, BT-05 e BT-06 com 12 mm e por fim BT-06 e BT-07 13mm. Os traços BT-07 e BT-08 estão fundidos por uma quebra, não conseguindo identificar a distância entre as bordas mais próximas entre si.

O Conjunto 3 (Fig. C-3) está localizado anterolateralmente na epífise distal do osso, do lado oposto ao Conjunto 1. Compreende duas perfurações muito rasas, uma semicircular (BT-09) e outra lenticular (BT-10), ambas com bordas irregulares (BT-09 e BT-10) e tendo 19 mm entre as bordas mais próximas, medindo 12 por 12 mm e 12 por 13 mm

Não foram identificadas estrias paralelas ou sulcos alongados associadas às perfurações.

RESULTADOS

Os traços encontrados incluem 10 pontuações (pits) organizadas em 3 conjuntos, dois menores, de dois traços cada, localizados em lados opostos da epífise distal do osso e um conjunto maior, incluindo 6 traços, localizado na diáfise do osso. Os traços são rasos a muito rasos, não ultrapassando o osso cortical, e têm formatos aproximadamente arredondados.

A disposição espacial dos agrupamentos sugere entre dois e três eventos distintos de mordida ou contato dentário.

Além dos traços de mordida, o espécime apresenta fissuras discretas e abrasão localizada nas epífises. Quebras no espécime permitem observar a presença de preenchimento ou infiltração por calcita, associadas à fase diagenética.

DISCUSSÃO

Atribuição icnotaxonômica

Os três conjuntos de traços apresentam morfologias compatíveis com o icnogênero Nihilichnus, conforme a diagnose emendada por LaBarge e Njau (2024), por constituírem depressões produzidas por compressão ou penetração em material esquelético, com contornos arredondados.

Os traços, todavia se restringem ao osso cortical, e, portanto, correspondem morfologicamente a pits, diferindo das punctures atribuídas a N. nihilicus, N. hastarius e N. sulcatus, nas quais há penetração através da cortical. Essa condição superficial é compartilhada por N. clavus e N. sicarius, que se distinguem principalmente pela geometria do contorno. Nihilichnus clavus apresenta pits circulares a elípticos, enquanto N. sicarius é caracterizado por pits lenticulares que não atravessam o osso cortical, apresentando dois vértices opostos no contorno.

Nesse contexto, os traços de contorno circular a elíptico (BT-2 a BT-09) são mais compatíveis com N. clavus. Por outro lado, os traços BT-01, BT-02 e BT-10, que apresentam contorno lenticular e vértices opostos, mostram maior semelhança morfológica com N. sicarius.

Comparação com traços produzidos por terópodes e crocodyliformes

Traços de mordida atribuídos a terópodes frequentemente incluem sulcos ou incisões alongadas, que podem ou não estar associadas a perfurações lenticulares, produzidas pelo contato de dentes labiolingualmente comprimidos com o osso. Em alguns casos, também ocorrem estrias relacionadas ao contato das carenas serrilhadas com a superfície óssea (e.g., Longrich et al., 2010; Hone e Tank 2015; Robinson et al., 2015; Hone et al., 2018; Brown et al., 2022; Reis et al., 2022; Lei et al., 2023). Traços atribuídos a grandes terópodes podem ainda incluir perfurações profundas, fraturas e áreas de esmagamento (Tanke and Currie, 1998; Buffetaut et al., 2004; Gignac e Erickson, 2017; Dalman et al., 2018; Brown et al., 2022).

Os traços de MCC 3249 diferem desse padrão por serem predominantemente circulares a semicirculares e por não apresentarem marcas de arraste, ranhuras ou estrias. Essa morfologia é mais compatível com perfurações produzidas por dentes cônicos ou subcônicos, como os de Crocodyliformes, que tendem a gerar marcas arredondadas.

Prováveis icnoprodutores

Crocodyliformes são os candidatos mais plausíveis para a produção dos traços aqui descritos, pois frequentemente apresentam dentes cônicos ou subcônicos capazes de produzir perfurações arredondadas em ossos. Todavia, para os conjuntos 1 e 3, não se pode descartar completamente a possibilidade de produção por terópodes de grande porte.

A fauna conhecida da Formação Açu inclui Crocodyliformes atribuídos a Peirosauridae, Itasuchidae, Candidodontidae e Sphagesauria. Entre esses grupos, formas de pequeno porte, como Candidodontidae e Sphagesauria, são menos prováveis como produtoras dos traços, enquanto Peirosauridae e Itasuchidae constituem hipóteses mais plausíveis. Ainda assim, a atribuição dos traços a um clado específico deve ser tratada com cautela, pois dependeria de comparações mais detalhadas entre espaçamento dentário, geometria da arcada, morfologia dos dentes e dimensões das perfurações.

Entre os grandes terópodes registrados para a Formação Açu, Carcharodontosauria, Megaraptora, Abelisauridae e Spinosauridae seriam os candidatos mais plausíveis, considerando o tamanho dos traços, mas a morfologia dos dentes e o padrão das mordidas não é compatível com esses animais.

Interpretação etológica e tafonômica

Os traços são interpretados etologicamente como marcas de alimentação produzidas em contexto postmortem, provavelmente associadas ao consumo ou manipulação da carcaça. A ausência de sinais de cicatrização ou remodelação óssea indica que o animal não sobreviveu por tempo suficiente após a produção das marcas para desenvolver resposta biológica detectável. Além disso, não foram observadas evidências claras de resistência ativa do animal às mordidas, como marcas extensas de arraste, sulcos associados à tração dos dentes ou padrões de dano compatíveis com luta durante a predação. Considerando a distribuição dos traços, sua ocorrência restrita à superfície cortical e a ausência de reação biológica do osso, a interpretação mais parcimoniosa é que essas marcas estejam relacionadas ao consumo oportunista da carcaça ou à manipulação pós-morte do elemento esquelético.

A presença dos traços de mordida indica que o osso esteve exposto e acessível a vertebrados durante parte da fase bioestratinômica. A presença de abrasão e fissuras discretas sugere algum grau de exposição e possível retrabalhamento antes do soterramento final.

Assim, MCC 3249 registra uma sequência tafonômica na qual a carcaça, ou parte dela, permaneceu exposta após a morte, foi acessada por vertebrados necrófagos ou predadores oportunistas, sofreu modificações superficiais e foi posteriormente soterrada e afetada por processos diagenéticos.

Conclusão

CONCLUSÃO

O registro de mordidas atribuídos ao icnogênero Nihilichnus associados ao espécime MCC-3249 representa a primeira evidência de detritivoria por Crocodyliformes para a Formação Açu, ampliando o entendimento icnológico conhecido para a Bacia Potiguar. Esses vestígios revelam comportamento de necrofagia por Crocodylomorpha,

provavelmente Itasuchidae, no processo de decomposição da carcaça antes de seu soterramento final.

Essas estruturas indicam que o espécime permaneceu exposto por tempo o suficiente para que predadores oportunistas se alimentarem da carcaça mas não tempo o suficiente para a colonização por invertebrados, reforçando a interpretação tafonômica de exposição subaérea e transporte moderado.

Este achado destaca a importância de estudos paleoicnológicos aplicados a fósseis vertebrados do Cretáceo nordestino, permitindo reconstruir não apenas a biota, mas também interações ecológicas que moldaram a tafocenose. Novas investigações sistemáticas em ossos da Formação Açu poderão revelar maior diversidade de icnotáxons, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da dinâmica paleoecológica e tafonômica da Bacia Potiguar durante o Albiano-Cenomaniano.

Referências

Referências

Albuquerque, A. S., Piacentini Pinheiro, A. E., Ribeiro, T. B., Bergqvist, L. P. & Pereira, P. V. L. G. C. (2025). Crocodyliform diversity of the Açu Formation (Albian–Cenomanian), Potiguar Basin, Brazil: geographical distribution and palaeobiological implications. Papers in Palaeontology, 11, e70027. https://doi.org/10.1002/spp2.70027

Hone, D. & Tanke, D. (2015). Pre- and postmortem tyrannosaurid bite marks on the remains of Daspletosaurus (Tyrannosaurinae: Theropoda) from Dinosaur Provincial Park, Alberta, Canada. PeerJ, 3, e885. https://doi.org/10.7717/peerj.885

Hone, D. W. E., Tanke, D. H. & Brown, C. M. (2018). Bite marks on the frill of a juvenile Centrosaurus from the Late Cretaceous Dinosaur Provincial Park Formation, Alberta, Canada. PeerJ, 6, e5748. https://doi.org/10.7717/peerj.5748

Leonardi, G., Santos, M. D. F. C. F. D. & Barbosa, F. H. D. S. (2021). First dinosaur tracks from the Açu Formation, Potiguar Basin (mid-Cretaceous of Brazil). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 93, e20210635. https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210635

Maraschin, A. J., Mizusaki, A. M., Vasconcelos, P. M., Hinrichs, R., De Ros, L. F. & dos Anjos, S. M. (2010). Definição da idade deposicional da Formação Açu (Bacia Potiguar, Nordeste do Brasil) através da datação. Pesquisas em Geociências, 37(2), 85–96. https://doi.org/10.22456/1807-9806.22649

Mikuláš, R., Kadlecová, E., Fejfar, O. & Dvořák, Z. (2006). Three new ichnogenera of biting and gnawing traces on reptilian and mammalian bones: a case study from the Miocene of the Czech Republic. Ichnos, 13(3), 113–127. https://doi.org/10.1080/10420940600850729

Pereira, P. V. L. G. C., Bandeira, K. L. N., Vidal, L. S., Ribeiro, T. B., Candeiro, C. R. dos A. & Bergqvist, L. P. (2024). A new sauropod species from north-western Brazil: biomechanics and the radiation of Titanosauria (Sauropoda: Somphospondyli). Zoological Journal of the Linnean Society, 202(4), zlae054. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlae054

Pessoa-Neto, O. P. et al. (2007). Bacia Potiguar. Boletim de Geociências da Petrobras, 15(2), 357–369.

Pirrone, C. A., Buatois, L. A. & Bromley, R. G. (2014). Ichnotaxobases for bioerosion trace fossils in bones. Journal of Paleontology, 88(1), 195–203.

Ribeiro, T. B., Vecchietti, L. F., Candeiro, C. R., Canale, J. I., Bergqvist, L. P., Brito, P. M. & Pereira, P. V. (2025). Overabundance of abelisaurid teeth in the Açu Formation (Albian-Cenomanian), Potiguar Basin, Northeastern Brazil: morphometric, cladistic and machine learning approaches. Journal of Vertebrate Paleontology, e2487366.

Robinson, R., Jasinski, S. & Sullivan, R. (2015). Theropod bite marks on dinosaur bones: indications of a scavenger, predator or both?; and their taphonomic implications. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin, 67, 275–282.

Rocha, M. P. S., Aureliano, T., Holgado, B., Santos, C. L. de A. & Ghilardi, A. M. (2025). Abelisauroids from equatorial Brazil: new records from the Açu Formation (Cenomanian), Potiguar Basin, Northeast Brazil. Journal of South American Earth Sciences, 166.

Santos, M. F. C. F., Florêncio, C. P., Perez, Y., Bergqvist, L., Porpino, K., Uchoa, A. & Lima-Filho, F. (2005). Dinossauros na Bacia Potiguar: o registro da primeira ocorrência. Boletim de Resumos Expandidos do XXI Simpósio de Geologia do Nordeste, 19, 325–328.

Schwimmer, D. (2010). Bite marks of the giant crocodylian Deinosuchus on Late Cretaceous (Campanian) bones. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin, 51, 183–190.

Sedorko, D. & Francischini, H. (2020). Icnologia: interações entre organismos e substratos. Curitiba: Editora CRV.

Souza, R. G., Figueiredo, R. G., Azevedo, S. A. K., Riff, D. & Kellner, A. W. A. (2019). Systematic revision of Sarcosuchus hartti (Crocodyliformes) from the Recôncavo Basin (Early Cretaceous) of Bahia, north-eastern Brazil. Zoological Journal of the Linnean Society.

Thomas, W. LaBarge & Jackson, K. Njau. (2024). Taxonomic reappraisal of Nihilichnus from taphonomic perspectives of crocodile predatory ecology. Ichnos, 31(1), 40–55.

Travasso, M. de Ricardo, Saudino, C. & Freitas, A. de Isabelle. (2021). Bacia Potiguar: sumário geológico e setores em oferta. ANP.

Wisshak, M., Knaust, D. & Bertling, M. (2019). Bioerosion ichnotaxa: review and annotated list. Facies, 65(2), 24.

CÓDIGO: SB1671

AUTOR: HELENA BEATRIZ AQUINO DE MEDEIROS

ORIENTADOR: RAQUEL CORDEIRO THEODORO

TÍTULO: Impacto de Íntrons Mitocondriais do Grupo I na Virulência e Atividade Mitocondrial em Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii

Resumo

Os íntrons do grupo I (IGI) são elementos genéticos autocatalíticos encontrados em genes mitocondriais de fungos, incluindo *Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii*, agentes etiológicos da criptococose. Seus efeitos sobre a função mitocondrial e a virulência fúngica ainda são pouco compreendidos. Este trabalho investigou a associação entre a quantidade de IGI no genoma mitocondrial de 27 isolados dos complexos *C. neoformans e C. gattii* e características de virulência: termotolerância, produção de melanina e resistência aos estresses oxidativo e nitrosativo. Os ensaios foram realizados de forma quantitativa, por densidade óptica, e qualitativa, por dot plating em isolados selecionados por contraste na quantidade de IGI. A termotolerância reduziu-se com o aumento da temperatura, com maior manutenção do crescimento em *C. gattii*. Na melanização, observou-se padrão oposto entre os complexos conforme a quantidade de IGI: cepas de *C. neoformans* com menos íntrons apresentaram maior produção, enquanto *C. gattii* com mais íntrons parecem sintetizar mais melanina. Padrão semelhante ocorreu nos estresses oxidativo e nitrosativo, com *C. neoformans* se sobressaindo no grupo de 0 a 4 IGI e *C. gattii* no de 5 a 10 IGI. Os achados sugerem que a quantidade de íntrons no mitogenoma de cepas dos complexos *C. neoformans e C. gattii* pode interferir na expressão de importantes fatores de virulência de forma diferenciada, possivelmente por interferir na função mitocondrial.

Palavras-chave: Íntrons. Mitocôndria. Virulência. Cryptococcus. Fungo. Temperatura.

TITLE: Impact of Group I Mitochondrial Introns on Virulence and Mitochondrial Activity in Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii

Abstract

Group I introns (IGI) are self-splicing genetic elements commonly found in mitochondrial genes of fungi, including *Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii*, the etiological agents of cryptococcosis. Their effects on mitochondrial function and fungal virulence remain poorly understood. This study investigated the association between the amount of IGI in the mitochondrial genome of 27 isolates from the *C.*

neoformans and C. gattii complexes and virulence-related traits: thermotolerance, melanin production, and resistance to oxidative and nitrosative stress. Assays were performed quantitatively, using optical density, and qualitatively, by dot plating in isolates selected for contrasting IGI amounts. Thermotolerance decreased with rising temperature, with greater growth maintenance in *C. gattii*. Regarding melanization, an opposite pattern was observed between the complexes according to IGI amount: *C. neoformans* showed higher production among isolates with fewer introns, while *C. gattii* stood out among those with more introns. A similar pattern occurred for oxidative and nitrosative stress, with *C. neoformans* standing out in the 0-4 IGI group and *C. gattii* in the 5-10 IGI group. The findings suggest that mitochondrial activity may be probably influenced by GII abundance, impacting the expression of virulence factors, and that this relationship with IGI amount depends on the species complex, reinforcing the role of the genetic background of each group.

Keywords: Introns. Mitochondria. Virulence. Cryptococcus. Fungus. Temperature.

Introdução

Os introns do Grupo I (IGI) são ribozimas capazes de realizar auto-splicing. Geralmente apresentam entre 250 e 500 nucleotídeos, embora alguns possam ultrapassar 500 pb e possuir organização mais complexa, incluindo genes funcionais e outras sequências associadas (Nielsen e Johansen, 2009; Haugen et al., 2005). Alguns IGI podem conter genes de homing endonucleases (HEGs), que estão associadas à mobilidade intrônica ou que podem participar do splicing desses elementos na função de maturases (Megarioti e Kouvelis, 2020).

Quanto à localização, em organismos eucarióticos os IGI podem estar presentes tanto no genoma nuclear quanto em organelas. Nos fungos, são frequentemente encontrados nos genomas mitocondriais, inseridos em genes relacionadosà síntese de proteínas que participam da fosforilação oxidativa, como cob, cox1–3 e os RNAs ribossomais mitocondriais rnl e rns (Corsaro e Venditti, 2020). Apesar de sua ampla distribuição, os efeitos fisiológicos desses elementos ainda são pouco compreendidos, especialmente em relação à função mitocondrial de fungos patogênicos (Liu e Pyle, 2024).

Evidências experimentais sugerem que a presença dos IGI pode influenciar a expressão gênica e a atividade mitocondrial. Em Saccharomyces cerevisiae, a ausência de introns mitocondriais promoveu aumento da expressão de cox1 e cob, do consumo de oxigênio e dos níveis celulares de ATP (Rudan et al., 2018). Esses achados indicam que os IGI podem estar relacionados à regulação do metabolismo energético e, consequentemente, a processos celulares dependentes da atividade mitocondrial.

Essa relação é particularmente relevante em fungos patogênicos do gênero Cryptococcus, dos complexos C. neoformans e C. gattii, causadores da criptococose, micose sistêmica caracteriazada pelo acometimento dos sistemas respiratório e nervoso central. que acomete em especial imunocomprometidos, como portadores de HIV/AIDS, transplantados e outros imunodeprimidos (OMS, 2022).

Sabe-se que a função mitocondrial está direta ou indiretamente associada a características importantes para a adaptação e a virulência fúngica. Alterações na atividade mitocondrial, por exemplo, podem influenciar a suscetibilidade a antifúngicos, como o fluconazol (Caza et al., 2016) e processos relacionados à adaptação e à virulência, incluindo mecanismos de resposta ao estresse que podem contribuir para a sobrevivência do fungo no hospedeiro, como a produção de melanina (Verma; Shakya; Idnurm, 2018). É crescente o corpo de estudos que mostra que a homeostase mitocondrial está relacionada à expressão de diferentes fatores de virulência em C. neoformans (Patiño-Medina; Camacho; Casadevall, 2026).

Nesse contexto, nosso trabalho buscou investigar a possível associação entre a presença de IGI no genoma mitocondrial de isolados de Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii e características relacionadas à função mitocondrial e à virulência. Para isso, foram avaliados o crescimento dos isolados sob condições de estresse oxidativo e nitrosativo, a produção de melanina e a termotolerância, buscando verificar se diferentes padrões de ocorrência desses elementos estão associados a alterações nesses fenótipos.

Metodologia

2.1 Isolados Utilizados Para os Ensaios

Para condução desta pesquisa, foram utilizados 27 isolados da micoteca do Laboratório de Micologia Médica IMT/UFRN. Na figura 1 há a tabela de especificações das cepas, por meio da identificação do complexo (C. neoformans ou C. gattii), nome e quantidade total de IGI de cada isolado. Ressaltamos que para os testes quantitativos foram utilizadas as 27 cepas mencionadas, enquanto para os ensaios qualitativos, apenas 4, sendo estas BT11, BT12, BT20 e BT8.

2.2 Ensaio Qualitativo (Dot Plating)

Para realização dos ensaios qualitativos foram utilizados somente 4 isolados: BT11 e BT12, cepas muito próximas geneticamente por serem do mesmo genótipo (VNI), contudo possuindo uma disparidade na quantidade total de IGI, 0 e 4 respectivamente. Do mesmo modo, do genótipo VGII foram escolhidas as cepas BT20 e BT8, com 2 e 6 IGI, respectivamente. Tais isolados foram cultivados em ágar YPD por 48h a 37ºC e em seguida as colônias foram ressuspendidas em solução salina 0,85. Para o preparo dos inóculos, as células foram contadas na câmara de Neubauer, sendo ajustados para 10^7 células /ml e diluídas para concentrações celulares finais de 10^6 , $2{,}15 \times 10^5$, $4{,}65 \times 10^4$ e 10^4 células /ml conforme Chang e Doering (2018). Cinco microlitros de cada diluição foram aplicados em placas do meio ágar, reagente e controle desejado para cada teste. Posteriormente, foram incubadas a 37°C e fotografadas a 48 e 72h.

2.3 Avaliação da Termotolerância

Para testar de modo qualitativo a resistência térmica, os isolados BT11, BT12, BT20 e BT8 foram cultivados em placas de ágar YPD por meio da diluição customizada

descrita no tópico 2.2. Estas foram incubadas por 48h a 25°C (temperatura ótima de crescimento fúngico) 37°C, 38°C e 39°C, posteriormente as placas foram fotografadas.

2.4 Avaliação Da Produção de Melanina

A produção de melanina foi avaliada quantitativamente por verificação de densidade óptica em placas de 96 poços, utilizando meio caldo L-DOPA 2× (composição: yeast nitrogen base; concentração final de 13,4 mg/mL, dextrose 2 mg/mL, glicina 2 mg/mL, fosfato monopotássico; 8 mg/mL, sulfato de magnésio; 20 µL/mL, tiamina; 1,04 µg/mL e L-3,4-dihidroxifenilalanina 0,4 mg/mL), conforme metodologia adaptada de Brilhante et al. (2017). As leveduras foram previamente cultivadas em YPD ágar e incubadas por 48h, posteriormente, suspensas em 5ml de solução salina estéril, com a concentração celular padronizada por escala de McFarland 1,0. Após diluição do inóculo (1:50), 100 µL da suspensão celular foi adicionada aos poços contendo 100 µL do meio L-DOPA 2x, totalizando 200 µL por poço, com as condições experimentais realizadas em triplicata. Como controle negativo, utilizou-se meio equivalente sem L-DOPA. As placas de 96 poços foram incubadas a 37 °C por sete dias e, ao final do período, a densidade óptica foi determinada a 490 nm. A produção de melanina foi estimada pelo valor médio da absorbância das triplicadas e, posteriormente, uma razão entre o teste (com L-DOPA) e seu respectivo controle. Para teste quantitativo utilizou-se os mesmo meios, porém, desta vez, suplementados com ágar bacteriológico (20g/L) e, análogo ao dot plaiting descrito no tópico 2.2, este ensaio foi realizado em triplicata porém sem diluição customizada.

2.5 Crescimento Sob Condições de Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Análogo ao teste de produção de melanina, para realização do ensaio quantitativo de crescimento sob condições estressante, utilizamos o meio YNB caldo 2x suplementado com 2% de glicose (w/v) e 25mM succinato de sódio, posteriormente, foi adicionado 0,5mM de H_2O_2 ou $NaNO_2$. Inicialmente os isolados foram cultivados em YPD e incubados a 35°C por 48h, as colônias foram ressuspendidas em 5ml de salina estéril e a concentração ajustada para McFarland 1,0. Após diluição do inóculo (1:50), 100 µL da suspensão celular foram adicionados aos poços contendo 100 µL do meio YNB caldo 2x e 0,5M do estressante, totalizando 200 µL por poço, com as condições experimentais realizadas em triplicata. Como controle negativo, será utilizado meio equivalente sem o fator de estresse (H_2O_2 ou $NaNO_2$). As placas de 96 poços foram incubadas a 37 °C durante 48h e, ao final do período, a densidade óptica foi determinada a 600 nm. Para teste quantitativo (Tópico 2.2) utilizou-se mesmo meios, porém, desta vez, suplementados com ágar bacteriológico (20g/L).

2.6 Análises Estatísticas

Para fins de análises preliminares foram observadas médias, medianas e desvios padrões. Entretanto, análises mais robustas ainda serão realizadas, em que os dados referentes aos IGI serão tratados como variáveis dicotômicas (presente ou ausente) para as variações específicas de cada intron e na avaliação dos introns em geral. Tais dados estatísticos serão obtidos por meio do programa Stata (v. 11.1).

3. Resultados e Discussão
3.1 Ensaio Qualitativo de Termotolerância A termotolerância dos isolados dos complexos *Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii* foi avaliada qualitativamente por dot plating em YPD ágar, nas temperaturas de 25, 37, 38 e 39 °C. Foram selecionados quatro isolados com maior contraste na quantidade total de introns do grupo I (IGI) dentro de cada complexo: BT11 e BT12, pertencentes ao complexo C. neoformans, com 0 e 4 IGI, respectivamente, e BT20 e BT8, pertencentes ao complexo *C. gattii*, com 2 e 6 IGI, respectivamente. A análise qualitativa foi realizada como complemento ao ensaio quantitativo previamente conduzido por outros integrantes do nosso grupo de pesquisa, permitindo quantificar mais precisamente as diferenças de crescimento entre os isolados e, posteriormente, aprofundar a devida discussão com base nas análises estatísticas (Figura 2). A 25 °C, todos os isolados apresentaram crescimento abundante. A 37 °C, observou-se redução da intensidade do crescimento nas maiores diluições, destacando-se a cepa BT12 por maior sensibilidade térmica. Essa redução tornou-se mais evidente a 38 e 39 °C, principalmente nos isolados do complexo *C. neoformans*. Em contrapartida, os isolados do complexo *C. gatti*i apresentaram menor redução do crescimento em temperaturas elevadas, especialmente a 38 °C. A 39 °C, embora todos os isolados tenham apresentado redução acentuada do crescimento, ainda foi possível observar crescimento nas menores diluições. De modo geral, o aumento da temperatura resultou em redução progressiva do crescimento dos isolados, com diferenças visíveis entre os complexos e entre os isolados avaliados. Esses resultados permitiram caracterizar qualitativamente o perfil de termotolerância destas cepas e forneceram uma base para investigar, em conjunto com os demais fenótipos avaliados, a possível relação entre a presença de IGI e características associadas à adaptação e virulência de Cryptococcus. A termotolerância é uma característica importante para a adaptação de Cryptococcus ao hospedeiro, uma vez que a capacidade de crescimento em temperaturas próximas à corporal é fundamental para o estabelecimento da infecção (Perfect, 2006). Neste estudo, observou-se redução progressiva do crescimento com o aumento da temperatura, com maior manutenção do crescimento dos isolados do complexo C. gattii. Embora os resultados qualitativos não permitam estabelecer uma relação direta entre o número de IGI e o crescimento em temperaturas variáveis, as diferenças observadas são relevantes, considerando que a termotolerância está associada à capacidade de Cryptococcus de sobreviver, permanecer se propagando e realizar a manutenção da função mitocondrial, esta que, por sua vez, participa da resposta ao ambiente estressor e, consequentemente na virulência em *C. neoformans* (Chang; Doering, 2018). Considerando que os IGI estão presentes em genes mitocondriais, as diferenças em sua quantidade e sítio de inserção podem potencialmente estar relacionadas a alterações na fisiologia mitocondrial e em características associadas à adaptação e virulência do fungo (Gomes et al., 2023; Gomes et al., 2024). Assim, os resultados obtidos não permitem atribuir à quantidade de IGI um efeito direto sobre a termotolerância. Entretanto, a variação observada entre os isolados indica que diferenças na composição de seus genomas mitocondriais podem estar relacionadas a características distintas na expressão dos fatores de virulência do patógeno. A análise integrada desses fenótipos poderá contribuir para esclarecer se a distribuição dos IGI é o fator de principal impacto aos diferentes perfis de adaptação e alta capacidade de infecção ao hospedeiro (Figura 3). Quando os isolados foram agrupados de acordo com a quantidade total de IGI, observou-se diferença no perfil de

melanização. Entre os isolados contendo 0 a 4 IGI, a produção média foi de 2,10 ± 1,84, sendo *C. neoformans* responsável pela maior média (2,69 ± 2,28) em comparação a *C. gattii* (1,43 ± 0,50). Já entre os isolados contendo 5 a 10 IGI, a média geral foi de 1,49 ± 0,44, com valores de 1,38 ± 0,32 para *C. neoformans* e 1,65 ± 0,59 para *C. gattii* (Figura 4). Quando os isolados foram agrupados de acordo com a quantidade total de IGI, observou-se diferença no perfil de melanização. Entre os isolados contendo 0 a 4 IGI, a produção média foi de 2,10 ± 1,84, sendo *C. neoformans* responsável pela maior média (2,69 ± 2,28) em comparação a *C. gattii* (1,43 ± 0,50). Já entre os isolados contendo 5 a 10 IGI, a média geral foi de 1,49 ± 0,44, com valores de 1,38 ± 0,32 para *C. neoformans* e 1,65 ± 0,59 para *C. gattii*. O ensaio qualitativo, realizado por dot plating como complemento à análise quantitativa, permitiu visualizar as diferenças de melanização entre os isolados selecionados. Na presença de L-DOPA, BT11, pertencente a *C. neoformans* e com 0 IGI, apresentou pigmentação mais intensa, enquanto BT12, da mesma espécie, genótipo e com 4 IGI, apresentou menor intensidade de pigmentação. Entre os isolados de C. gattii, BT20, com 2 IGI, não apresentou melanização evidente, enquanto BT8, com 6 IGI, apresentou a melanização mais intensa da placa. Para o controle, em placa sem L-DOPA, não foram observadas diferenças de pigmentação comparáveis às observadas na condição indutora. A importância da melanização para a virulência está relacionada, principalmente, à capacidade desse pigmento de aumentar a resistência do fungo a diferentes formas de estresse. A melanina pode proteger as células contra danos oxidativos e contribuir para sua sobrevivência diante de mecanismos efetores do hospedeiro, além de apresentar propriedades que podem reduzir os efeitos de condições ambientais desfavoráveis (Nosanchuk; Casadevall, 2006). Nesse contexto, a produção de melanina não representa apenas uma característica fenotípica, mas um mecanismo que pode favorecer a persistência de Cryptococcus durante a infecção. As diferenças observadas na produção de melanina entre os isolados podem refletir diferentes estratégias de adaptação associadas à patogenicidade. A relação entre os IGI e a produção de melanina torna-se particularmente relevante considerando o papel central da mitocôndria na adaptação do Cryptococcus ao meio. Alterações na função mitocondrial podem repercutir sobre a capacidade celular de responder a condições de estresse, uma vez que a atividade dessa organela está diretamente relacionada ao metabolismo energético e à sinalização celular. Nesse contexto, a comunicação entre mitocôndria e núcleo pode promover ajustes na expressão de genes envolvidos na resposta a alterações ambientais, influenciando características importantes para a adaptação e a virulência fúngica (Jazwinski, 2013; Rudan et al., 2018). Esse comportamento é relevante diante da hipótese de que a redução ou ausência de IGI possa favorecer características associadas à virulência. Em C. neoformans, a maior produção de melanina foi do isolado com menor quantidade de IGI, compatível com a hipótese anteriormente mencionada. Entretanto, em C. gattii, foi observado um padrão diferente, com maior produção de melanina, justamente, do isolado com maior quantidade de IGI. Dessa forma, a relação entre a quantidade de IGI e fatores de virulência pode variar entre os complexos. Essa diferença pode estar relacionada ao contexto genético e evolutivo de cada complexo. Os IGI apresentam variação em sua presença e distribuição entre diferentes linhagens, decorrente de processos de ganho, perda e diversificação desses elementos ao longo da evolução (Wu e Hao, 2014). Em Cryptococcus, Gomes et al. (2023) observaram diferenças na distribuição e nos polimorfismos dos IGI mitocondriais entre C. neoformans e C. gattii, além de evidências de ancestralidade comum entre introns presentes nos mesmos sítios de inserção. Esses dados indicam que a quantidade de IGI observada atualmente pode refletir diferentes histórias de manutenção e perda desses elementos entre as linhagens.

Assim, embora a quantidade de IGI possa estar associada a diferenças na expressão de características de virulência, essa relação pode não ocorrer de maneira uniforme entre os complexos, considerando as particularidades genéticas e evolutivas de cada um. Em conjunto, os resultados indicam que a produção de melanina apresentou comportamento distinto entre os complexos em relação à quantidade de IGI. Enquanto em C. neoformans a menor quantidade de IGI esteve associada a maior produção de melanina, em C. gattii observou-se o padrão oposto. Esses achados reforçam a possibilidade de que os IGI possam estar relacionados à expressão de características de virulência de maneira dependente do complexo, destacando a importância de considerar o contexto genético e evolutivo de cada grupo.

3.3 Estresse Oxidativo e Nitrosativo Os estresses oxidativo e nitrosativo mimetizam condições semelhantes àquelas encontradas no interior do fagossomo de células fagocíticas, como os macrófagos. A capacidade de resistir e de replicar-se na presença desses compostos nocivos constitui um importante fator de virulência fúngica. Os resultados referentes a esses ensaios encontram-se apresentados nas Figuras 5, 6, 7 e 8. A resistência ao estresse nitrosativo foi avaliada nos isolados dos complexos Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii por meio das análises quantitativa e qualitativa, utilizando $NaNO_2$ como agente estressor. Na avaliação quantitativa, os complexos apresentaram valores próximos de eficiência de crescimento, com média de 0,92 ± 0,33 para C. neoformans e 0,90 ± 0,31 para C. gattii (Figura 5). Entre os isolados com 0–4 IGI, C. neoformans apresentou maior eficiência média de crescimento (0,99 ± 0,29) em comparação a C. gattii (0,82 ± 0,28). Já no grupo com 5–10 IGI, o comportamento foi inverso, com C. gattii apresentando maior eficiência de crescimento (1,00 ± 0,34) em relação a C. neoformans (0,86 ± 0,38). A média geral foi de 0,92 ± 0,29 para os isolados com 0–4 IGI e 0,91 ± 0,35 para aqueles com 5–10 IGI (Figura 6). No ensaio qualitativo, realizado por dot plating, a placa controle obteve crescimento de padrão irregular, destacando as cepas BT11 e BT12 do complexo C. neoformans. Na presença de $NaNO_2$, foi observada redução na intensidade do crescimento principalmente nas maiores diluições do inóculo fúngico, com resposta variável entre os isolados. Entre as cepas de C. neoformans, a redução foi mais evidente, enquanto os isolados de *C. gattii* mantiveram crescimento mais intenso. Assim, embora as médias gerais de eficiência de crescimento tenham sido semelhantes entre os dois complexos, a distribuição dos resultados de acordo com a quantidade de IGI revelou maior eficiência de crescimento de C. neoformans entre os isolados com 0–4 IGI, enquanto *C. gattii* apresentou maior eficiência entre aqueles com 5–10 IGI. Essas diferenças também foram observadas visualmente no dot plating, que permitiu caracterizar o padrão de crescimento dos isolados sob estresse nitrosativo. Semelhante ao impacto avaliado para o nitrito de sódio, a avaliação quantitativa da resistência ao estresse oxidativo apresentou valores médios próximos entre os complexos, com eficiência de crescimento de 1,02 ± 0,36 para *C. neoformans* e 1,10 ± 0,29 para *C. gattii*. Ao considerar a quantidade total de IGI, os isolados contendo 0 a 4 IGI apresentaram eficiência média de 1,01 ± 0,36, sendo os valores de *C. neoformans* (1,03 ± 0,43) e C. gattii (0,99 ± 0,29) semelhantes. Já no grupo com 5 a 10 IGI, foi observada média de 1,10 ± 0,29, com *C. neoformans* apresentando 1,01 ± 0,31 e *C. gattii* 1,23 ± 0,24. O ensaio qualitativo por dot plating permitiu observar o crescimento não uniforme dos isolados, conforme diferentes diluições sob estresse oxidativo. Enquanto na condição controle foi observado crescimento significativo para todas as diluições em *C. gattii*, para *C. neoformans*, o próprio meio e/ou temperatura surtiu efeito negativo para o crescimento destes isolados. Na presença do agente estressor (peróxido de oxigênio) houve redução do crescimento nas maiores diluições do complexo *C. gattii*, enquanto C.neoformans

manteve-se semelhante ao controle. Desta forma, os resultados indicaram pouca diferença na resistência ao estresse oxidativo entre os complexos quando analisados independentemente da quantidade de IGI. Entretanto, a estratificação pelo número de introns evidenciou uma maior eficiência de crescimento de *C. gattii* no grupo com 5 a 10 IGI, enquanto *C. neoformans* apresentou valores semelhantes entre os grupos. A resistência aos estresses oxidativo e nitrosativo é um dos principais fatores de virulência de Cryptococcus, uma vez que essas condições se assemelham ao ambiente encontrado no interior de células fagocitarias durante a infecção. Ao ser fagocitado por macrófagos, o fungo é exposto a uma explosão respiratória (respiratory burst), na qual são gerados intermediários reativos de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) com potencial de danificar proteínas, lipídeos de membrana e o DNA fúngico. Isolados capazes de neutralizar esses compostos conseguem não apenas sobreviver, mas também se replicar dentro dos macrófagos, o que é particularmente relevante no caso de Cryptococcus, já que a persistência intracelular nesses fagócitos funciona como mecanismo de disseminação do fungo pelo organismo, favorecendo a chegada a sítios mais distantes, como o sistema nervoso central, onde o fungo causa a meningoencefalite característica da criptococose (COX et al., 2000; DE JESÚS-BERRÍOS et al., 2003). No presente estudo, os complexos C. neoformans e *C. gattii* apresentaram eficiência de crescimento semelhante tanto sob estresse nitrosativo quanto sob estresse oxidativo quando analisados de forma geral e quantitativa, o que indica que ambos os complexos possuem mecanismos eficientes de resposta a esses dois tipos de dano. No entanto, ao avaliar os isolados no ensaio qualitativo por dot plating, ficou evidente que *C. gattii* manteve um padrão de crescimento mais consistente, inclusive nas maiores diluições fúngicas em ambos os estresses, enquanto *C. neoformans* apresentou maior redução bastante significante para o crescimento das colônias, principalmente sob $NaNO_2$. Esse comportamento sugere que, apesar da semelhança nas médias quantitativas, *C. gattii* pode possuir uma resposta mais robusta e homogênea aos dois tipos de estresse, achado também relatado por Sena et al. (2019) ao comparar a cepa R265 de *C. gattii* com a cepa H99 de *C. neoformans*. Verma, Shakya e Idnurm (2018) reforçam que alterações na função mitocondrial em fungos patogênicos afetam diretamente a capacidade de resposta as espécies reativas, uma vez que a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons (CTE), abriga parte da maquinaria antioxidante da célula, incluindo enzimas dependentes de NADPH que participam da destoxificação tanto de ROS quanto de RNS, de modo que qualquer alteração na eficiência mitocondrial pode comprometer simultaneamente a geração controlada e a neutralização dessas espécies reativas. Gomes et. al. (2024) complementam essa discussão ao destacar que, embora os introns do grupo I sejam predominantemente autocatalíticos, sua excisão eficiente do transcrito primário é essencial para a correta maturação do RNA mensageiro mitocondrial, e que falhas nesse processo podem comprometer a montagem funcional dos complexos respiratórios da CTE. Os autores ainda apontam que a presença desses introns tem sido cada vez mais explorada como ferramenta de interesse em micologia médica, tanto para fins de identificação molecular de espécies quanto para a compreensão de seu possível papel funcional na fisiologia do fungo. Dessa forma, a variação na quantidade de IGI entre os isolados avaliados no presente estudo não representa apenas uma diferença genômica pontual, mas um fator com potencial real de interferir na eficiência da cadeia respiratória mitocondrial, e, por consequência, na capacidade de resposta desses isolados aos estresses oxidativo e nitrosativo impostos pelo hospedeiro.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam uma possível associação entre a quantidade de íntrons do Grupo I (IGI) presentes no mitogenoma e a expressão de fenótipos relacionados à virulência de Cryptococcus sp. Essa relação porém, apresentou comportamentos distintos entre os complexos C. neoformans e C. gattii, sugerindo que o contexto genético e evolutivo de cada grupo pode influenciar os efeitos associados à presença ou ausência desses elementos. Dessa forma, os resultados obtidos reforçam a importância de investigar a participação do mitogenoma na adaptação e na expressão de características relacionadas à virulência desses fungos.

Os ensaios realizados também permitiram observar que a relação entre a quantidade de IGI e os fenótipos avaliados não apresenta um padrão único entre os dois complexos. Enquanto em C. neoformans a menor quantidade de IGI esteve associada, em diferentes ensaios, a características mais favoráveis à virulência, em C. gattii foram observados padrões opostos. Os ensaios em andamento, utilizando diferentes fontes de carbono e inibidores da cadeia transportadora de elétrons, buscam complementar esses resultados, avaliando possíveis alterações no metabolismo e na função mitocondrial associadas à variação dos IGI.

Contudo, novos ensaios e análises estatísticas mais robustas fazem-se necessários para validar essas observações. O aprofundamento no conhecimento acerca da influência do mitogenoma sobre a virulência fúngica poderá não apenas ampliar a compreensão sobre a aptidão ecológica e patogênica desses microrganismos, mas também abrir perspectivas promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Referências

5. Referências

BRILHANTE, R. S. N. et al. An alternative method for the analysis of melanin production in Cryptococcus neoformans sensu lato and Cryptococcus gattii sensu lato. Mycoses, v. 60, p. 697–702, 2017.

CAZA, M. et al. The zinc finger protein Mig1 regulates mitochondrial function and azole drug susceptibility in the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. mSphere, v. 1, n. 1, e00080-15, 2016.

CHANG, A. L.; DOERING, T. L. Maintenance of mitochondrial morphology in Cryptococcus neoformans is critical for stress resistance and virulence. mBio, v. 9, e01375-18, 2018.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infection and Immunity, v. 68, p. 443–448, 2000.

DE JESÚS-BERRÍOS, M. et al. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. Current Biology, v. 13, p. 1963–1968, 2003.

GOMES, R. M. O. D. S.; DA SILVA, K. J. G.; FERREIRA, L. C.; ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C. Distribution and polymorphisms of group I introns in mitochondrial genes from Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. Journal of Fungi, v. 9, p. 629, 2023.

GOMES, R. M. O. D. S.; DA SILVA, K. J. G. D.; THEODORO, R. C. Group I introns: structure, splicing and their applications in medical mycology. Genetics and Molecular Biology, v. 47, Suppl. 1, e20230228, 2024.

JAZWINSKI, S. M. The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1833, p. 400–409, 2013.

LIU, T.; PYLE, A. M. Highly reactive group I introns ubiquitous in pathogenic fungi. Journal of Molecular Biology, v. 436, 168513, 2024.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm formation by Cryptococcus neoformans. Microbiology Spectrum, v. 3, 10.1128/microbiolspec.MB-0006-2014, 2015.

MEGARIOTI, A. H.; KOUVELIS, V. N. The coevolution of fungal mitochondrial introns and their homing endonucleases (GIY-YIG and LAGLIDADG). Genome Biology and Evolution, v. 12, p. 1337–1354, 2020.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 3519–3528, 2006.

PATIÑO-MEDINA, J. A.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Metabolic plasticity and virulence of Cryptococcus neoformans are regulated by mitochondrial homeostasis. bioRxiv, 2026.

PERFECT, J. R. Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot. FEMS Yeast Research, v. 6, p. 463–468, 2006.

RUDAN, M. et al. Normal mitochondrial function in Saccharomyces cerevisiae has become dependent on inefficient splicing. eLife, v. 7, p. 1–17, 2018.

UENO, K.; YANAGIHARA, N.; OTANI, Y.; SHIMIZU, K.; KINJO, Y.; MIYAZAKI, Y. Neutrophil-mediated antifungal activity against highly virulent Cryptococcus gattii strain R265. Medical Mycology, v. 57, n. 8, p. 1046–1054, 2019.

VERMA, S.; SHAKYA, V. P. S.; IDNURM, A. Exploring and exploiting the connection between mitochondria and the virulence of human pathogenic fungi. Virulence, v. 9, n. 1, p. 426–446, 2018. DOI: 10.1080/21505594.2017.1414133.

WU, B.; HAO, W. Horizontal transfer and gene conversion as an important driving force in shaping the landscape of mitochondrial introns. G3: Genes, Genomes, Genetics, v. 4, n. 4, p. 605–612, 2014. DOI: 10.1534/g3.113.009910.

XUE, P. et al. The interplay between electron transport chain function and iron regulatory factors influences melanin formation in Cryptococcus neoformans. mSphere, v. 9, n. 5, e00250-24, 2024.

Anexos



FIGURA 2



FIGURA 3



FIGURA 4



FIGURA 5



FIGURA 6



FIGURA 7



FIGURA 8



FIGURA 1 (IDENTIFICAÇÃO DOS INTRONS)

CÓDIGO: SB1674

AUTOR: LETICIA MARIA DA SILVA BRAGA

ORIENTADOR: RAQUEL CORDEIRO THEODORO

TÍTULO: BUSCA DE GENES CODIFICADORES DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM TENEBRIO MOLITOR PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO FRENTE A INFECÇÃO POR CRYPTOCOCCUS

Resumo

Peptídeos antimicrobianos são moléculas compostas por entre 20 e 100 aminoácidos produzidos pelo sistema imune inato e que desempenham importante atividade durante infecções patogênicas. Pesquisas sobre seus mecanismos e contra quais espécies de patógenos cada família de AMP age são de grande interesse. Sabendo que muitos dos AMPs já descritos em bancos de dados são provenientes de insetos e que o coleoptera *Tenebrio molitor* está sendo um eficiente modelo de infecção experimental, este trabalho objetivou encontrar genes codificadores de AMPs homólogos aos AMPs dos insetos descritos na revisão de Zhou et al., 2024 e testar a sua expressão a partir do desenho de primers os quais foram submetidos a PCR com cDNA da larva, seguida de eletroforese. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram os patógenos escolhidos para infectar as larvas de *T. molitor* por eles serem os agentes etiológicos da criptococose, uma infecção fúngica sistêmica que atinge tanto pessoas imunocomprometidas quanto imunocompetentes e que é considerada de importância crítica pela OMS. Os resultados obtidos a partir da curva de sobrevivência e da recuperação de UFCs mostraram maior virulência do isolado R265 (*C. gattii*) em relação ao H99 (*C. neoformans*). Por meio da PCR e da eletroforese, foi possível confirmar a homologia de 4 família de AMPs (Acalolpetin, Attacin, Coleoptericin e Tenecin) entre os genes do *T. molitor* e dos insetos com AMPs já descritos.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. AMPs. Tenebrio molitor. Cryptococcus spp.

TITLE: SEARCH FOR GENES ENCONDING ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN MEALWORMS (TENEBRIO MOLITOR) FOR EXPRESSION ANALYSIS AGAINST CRYPTOCOCCUS INFECTION

Abstract

Antimicrobial peptides are molecules composed of between 20 and 100 amino acids produced by the innate immune system that play an important role during pathogenic infections. Research into their mechanisms of action and the specific pathogen species targeted by each AMP family is of great interest. Given that many of the AMPs already described in databases are derived from insects and that the beetle *Tenebrio molitor* serves as an effective model for experimental infection, this study aimed to identify AMPs encoding genes homologous to the insect AMPs described in the review by Zhou et al., 2024, and to test their expression by designing primers that were subjected to PCR with larval cDNA, followed by electrophoresis. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* were the pathogens chosen to infect *T. molitor* larvae because they are the causative agents of cryptococcosis, a systemic fungal infection that affects both immunocompromised and immunocompetent individuals and is considered of critical importance by the WHO. The results obtained from the survival curve and CFU recovery showed greater virulence of isolate R265 (*C. gattii)* compared to H99 (*C. neoformans*). Using PCR and electrophoresis, it was possible to confirm the homology of four AMP families (Acalolpetin, Attacin, Coleoptericin, and Tenecin) between the genes of *T. molitor* and those of insects with previously described AMPs.

Keywords: Antimicrobial peptides. AMPs. Tenebrio molitor. Cryptococcus spp.

Introdução

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs), compostos por até 100 aminoácidos (Ma et al., 2024), estão presentes em artrópodes, moluscos, equinodermos, cordados vertebrados, plantas e microrganismos, e atuam no sistema imunológico inato através, principalmente, da via de sinalização Fator Nuclear Kappa B (NF-kB) contra patógenos bacterianos, fúngicos, virais e parasitários, e contra células cancerígenas (Huan et al., 2020; Petronio Petronio et al., 2022). Os mecanismos de ação dos AMPs são variados. pois dependem do patógeno presente e da ativação pelo sistema imune, mas atuam em forma de coquetéis sinérgicos, ou seja, são expressos em conjunto, sobre a parede celular, a membrana plasmática, os biofilmes, o interior da célula e os efeitos das partículas virais (Li et al., 2022). Os AMPs são classificados em dois grupos diferentes: catiônicos e aniônicos. Os catiônicos são subdivididos em: peptídeos ricos em cisteína (defensinas), os peptídeos α-helicoidais (cecropinas), peptídeos ricos em glicina (attacinas), e peptídeos ricos em prolina (drosocinas) (Manniello et al., 2021). Por outro lado, os aniônicos formam um pequeno e diverso grupo que aparenta ter evoluído para garantir a resposta imune humoral contra patógenos resistentes aos peptídeos catiônicos (Sowa-jasiłek et al., 2014).

O artigo de revisão de Oliveira Júnior et al., 2025 mostrou um compilado de AMPs sintetizados com base em peptídeos antimicrobianos presentes em insetos e no peixe tilápia que estão sendo testados clinicamente e possuem ação antibacteriana contra espécies como Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus. Esta abordagem é promissora tendo em vista a emergência de resistência aos remédios antibacterianos amplamente utilizados (Huan et al., 2020), o mesmo interesse está sendo volta para fungos patogênicos

devido à resistência aos antifúngicos.
Os principais resultados encontrados com fungos mostraram que AMPs (Gallerimicna, Galiomicina, GmPC8 e AP2) presentes na hemolinfa de larvas de Galleria mellonella apresentam ação antifúngica contra Candida albicans (Dekkerová-Chupáčová et al., 2018; Kordaczuk et al., 2022). Além disso, peptídeos como Heliomicina, Jelleína e MAF-1A provenientes dos insetos Heliothis virescens, Apis mellifera e Musca domestica, respectivamente, também demonstraram efeito antifúngico contra C. albicans (Perez-Rodriguez et al., 2022).
Sabendo que a Organização Mundial da Saúde caracterizou as espécies Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii – agentes causadores da criptococose, uma infecção que afeta os sistemas respiratório e nervoso central – como fungos patogênicos prioritários, devido ao elevado número de mortes anuais (~180.000), tanto de pessoas imunocompetentes quanto de pessoas imunocomprometidas, em todo o mundo (Dao et al., 2024; Do Carmo et al., 2022); torna-se necessário o aprofundamento dos estudos com AMPs a partir da infecção por este patógeno.
Ademais, o coleoptera Tenebrio molitor mostra ser um modelo de infecção experimental alternativo devido à facilidade logística e burocrática, à suportarem temperaturas mais elevadas, chegando até 37°C (Torres et al., 2020), além da relativa similaridade imunológica com vertebrados, o que inclui a síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) – a qual ocorre no início da fagocitose induzida pelos hemócitos e na ativação da cascata da profenoloxidase (Tindwa et al., 2013), enzima que regula o processo de melanização (Jang et al., 2022).
Por fim, tendo em vista que o DvAMP foi inicialmente encontrado na mosca Drosophila virilis e, posteriormente, como um peptídeo homólogo na G. mellonella e que ele apresentou ações in vivo e in vitro contra a cepa de referência H99 (C. neoformans) (Yang et al., 2023), este trabalho objetivou pesquisar a homologia, a expressão e a ação antifúngica de novos AMPs em larvas de T. molitor frente a infecção por Cryptococcus spp. a partir da análise de uma lista com diversos peptídeos antimicrobianos de insetos presente na revisão de Zhou et al., 2024.

Metodologia

FUNGOS A SEREM USADOS
Como a finalidade deste trabalho foi a padronização de um estudo de expressão de AMP em T. molitor infectados com Cryptococcus spp., apenas as cepas de referência H99 (C. neoformans) e R265 (C. gattii) foram utilizadas.
Os isolados fúngicos foram cultivados em meio Sabouraud Dextrose Agar (ASD) a 30°C para crescimento por 48 horas e mantidos em geladeira por no máximo 2 meses, para então novo subcultivo ser realizado.

CULTIVO E PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS
Duas alçadas do crescimento leveduriforme, com dois dias de cultivo (48h), foi lavada e homogeneizada em um microtubo de 1,5mL com 1000µL de PBS (pH 7.4 da Sigma), e, em seguida, foi centrifugado a 6000 xg, 4°C por 3 minutos. Após o sobrenadante ter sido descartado, este processo foi repetido mais duas vezes. Depois, as células leveduriformes foram ressuspendidas com 500µL de

PBS. A viabilidade fúngica dos inóculos foi aferida microscópicamente com corante nanquim (tinta da China) e apenas os inóculos com células viáveis foram selecionados para o experimento.
Para ajustar a concentração de células do inóculo para 2x105 células/µL, realizou-se uma diluição 1:200, sendo 1µL do inóculo e 199µL de salina 0,85%. Em seguida, pipetou-se 10µL do inóculo diluído em um hemocitômetro manual (Câmara de Neubauer) para fazer a contagem das células e realizar o cálculo de concentração de células/uL.

MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE T. MOLITOR, ENSAIO IN VIVO DE INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL E DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA
A colônia de T. molitor é mantida em caixas de plástico, a temperatura ambiente (28°C) na ausência de claridade incidente. Cada fase do ciclo de vida é compartimentalizada (larva, pupa e besouro) para otimizar o desenvolvimento da colônia. A alimentação da colônia é baseada em uma ração cuja a base é composta por derivados de trigo (36,36% de farelo de trigo, 18,18% de germe de trigo, 18,18% de farinha de trigo, 16,36% de aveia em flocos, 10,9% de extrato de soja e 0,04% de cloranfenicol), (De Souza et al., 2015).
Para o experimento, selecionou-se 30 larvas adultas por inóculo, com peso entre 150-200 mg, sem traços de injúria ou melanização, e dividiu-as em 3 placas de petri com 10 larvas em cada. Cada grupo teste foi inoculado com 5 µL de inóculo fúngico ou PBS, utilizando uma Seringa Hamilton (701 N, 26's gauge, 10 µL), na porção ventral da hemocele do animal, no segundo ou terceiro esternito posterior ao último par de apêndices locomotores; e incubado a 35ºC. A morte foi determinada a partir da ausência de movimento na presença de estímulo físico, junto com a presença da melanização cuticular durante o período de dez dias. Os resultados foram submetidos à análise de curva de sobrevivência do software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), o qual utiliza o método Kaplan-Meier e realiza a análise estatística pelo teste log-rank (Mantel-Cox). O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RECUPERAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC'S)
No experimento de recuperação fúngica, foram infectadas 10 larvas por cepa com 5µL da suspensão (inóculo final) contendo 2x105 células/µL, e incubadas por 24h a 25°C e 35ºC. Após o período de incubação, 3 entre as 10 larvas inoculadas foram escolhidas, lavadas três vezes com álcool 70% e em seguida três vezes com salina (0,85%), decapitadas com o auxílio de um bisturi e seu conteúdo corporal, exceto a exocutícula, foi extraído e diluído em PBS, sendo 1000µL da solução por larva. A partir desta diluição da hemolinfa larval, outra diluição foi feita: 1:100. Posteriormente, aplicou-se e semeou-se 20µL da diluição em 3 distintas placas de Petri com Ágar Niger. Por fim, depois de 48h de incubação a 35ºC (período de crescimento exponencial médio de Cryptococcus), foram contabilizadas as unidades formadoras de colônia as quais se caracterizam pelo crescimento leveduriforme em formato arredondado de coloração amarronzada.
Este procedimento também foi realizado com o grupo de larvas de controle negativo, nas quais foi inoculado apenas PBS.

BUSCA POR GENES AMPs NO GENOMA DO T. MOLITOR

Poucos AMPs em T. molitor foram relatados como antifúngicos, como a Tenecina 3 (TmTen3) e Taumatina-like 1 (TmTLP1) (Maistrou et al., 2018; Keshavarz et al., 2019). Por essa razão, novos genes foram procurados no genoma do T. molitor, tendo como referência AMPs já conhecidos com ação antifúngica em outros insetos.
Assim, inicialmente, foram buscadas sequências de genes de peptídeos antimicrobianos de outros insetos, de ação antifúngica reconhecida, na lista da revisão recente de Zhou et al. (2024). Posteriormente, filtrou-se a planilha, evidenciando os genes com ação antifúngica e pertencentes a insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera. Os códigos destes genes foram usados para comparação com o banco de dados de nucleotídeos traduzidos do genbank através da ferramenta “tblastx” do NCBI, utilizando como espécie de interesse o T. molitor. As sequências com identidade e cobertura maiores que 60% foram selecionadas para o desenho de primers.

DESENHO DE PRIMERS E TESTE EM PCR
Após a aquisição das sequências dos potenciais genes AMP de T. molitor, a sequência codificadora foi usada para o desenho de primers (íntrons e regiões regulatórias descartados) no site Primer3Plus. Os primers foram desenhados para amplificarem de 90 a 150 nucleotídeos e, em seguida, foram encomendados e testados em PCR convencional.
Para testar os primers (confirmar o anelamento e a amplificação da região específica para o qual foram desenhados), foi realizado PCR simples com a enzima GoTaq, seguindo instruções do fabricante. A termociclagem consistiu em um ciclo inicial de 2 minutos a 95ºC para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 95ºC, 1 minuto de anelamento a 58ºC, 30 segundos de extensão a 72ºC e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72ºC. O produto destes PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo a 80V.

Resultados e Discussões

Primeiramente, foram realizados testes de curva de sobrevivência nas larvas de *Tenebrio molitor* porque, durante os experimentos do trabalho anterior, os resultados do grupo controle (PBS) apresentaram elevada taxa de mortalidade, ainda mais em comparação aos resultados expostos nos artigos publicados os quais divulgam 100% de sobrevivência das larvas ao final dos 10 dias de experimento (de Souza et al., 2015). Este experimento consistiu em 8 grupos (com 10 larvas em cada e realizado em triplicata) que foram submetidos a estufas em temperatura ambiente (25°C) e à 35°C e divididos em: larvas que sofreram apenas o furo da agulha da seringa Hamilton (Furo), larvas inoculadas com salina 0,85%, larvas inoculadas com PBS e larvas colocadas diretamente na estufa sem inóculo e sem furo (SF/SI).

Como resultado desta primeira etapa, obteve-se 100% e 80% de sobrevivência no grupo SF/SI a 25°C e a 35°C, respectivamente; e 90% de sobrevivência no grupo Furo a 25°C e 80% a 35°C. No grupo de larvas inoculadas com salina 0,85%, a 25°C ocorreu 20% de morte e a 35°C, 40% de morte. Já para

inoculações com PBS, houve 10% e 20% de morte no grupo a 25°C e 35°C, respectivamente (Figura 1). Com isso, percebe-se que apesar do *T. molitor* ser um modelo de estudo resistente a temperaturas mais elevadas (de Souza et al., 2018), o aumento da temperatura do ambiente em que as larvas estão em relação à temperatura ideal para a manutenção da colônia (28°C) é um fator estressante que impacta na sua sobrevivência e deve ser considerado nas comparações entre os grupos controles e os testes.

O experimento realizado por Rodrigues et al., 2025 com infecção por *Candida auris* em *Tenebrio molitor* corrobora o resultado de que a sobrevivência das larvas com inoculação de PBS e sem inoculação não é 100%.

Após a definição do PBS como controle, experimentos com inoculação na concentração de 2x105 células/uL das cepas H99 (*C. neoformans*) e R265 (*C. gattii*) foram realizados e os resultados obtidos no gráfico de Kaplan-Meier foram: 100% e 80% de sobrevivência para o grupo controle a 25°C e 35°C, respectivamente. No grupo inoculado com R265, todas as larvas morreram após 7 e 8 dias, a 35°C e 25°C, respectivamente. Para o grupo das larvas inoculadas com H99, todas as larvas morreram após 8 e 9 dias, a 35°C e 25°C, respectivamente (Figura 2). O valor do teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi P <0,0001, comprovando a diferença significativa entre as curvas.

Quanto às recuperações das unidades formadoras de colônia (UFCs), para o inóculo fúngico de *C. neoformans*, foi produzido uma média de 8.333 UFC/mL (15.000 UFC/mL na placa 1 e 5.000 UFC/mL nas placas 2 e 3) nas larvas incubadas a 25°C e média de 15.666 UFC/mL (25.000 UFC/mL na placa 1, 20.000 UFC/mL na placa 2 e 5.000 UFC/mL na placa 3) nas larvas incubadas a 35°C. Já para o inóculo de *C. gattii*, o resultado para 25°C foi em média 61.666 UFC/mL (80 mil UFC/mL - placa 1; 65 mil UFC/mL - placa 2; 40 mil UFC/mL - placa 3) e, para 35°C, foi 46.666 UFC/mL (55 mil UFC/mL - placa 1; 50 mil UFC/mL - placa 2; e 35 mil UFC/mL - placa 3). Não houve crescimento fúngico em nenhuma das três placas do grupo controle (Figura 3).

Com isso, nota-se que apesar da grande diferença nos valores de UFC/mL entre as inoculações a 25°C, a taxa de mortalidade é semelhante, diferenciando-se apenas pelo fato de que as larvas inoculadas com o isolado R265 morrem em pequenos intervalos e as inoculadas com o isolado H99 tem maior intervalo de morte e mais indivíduos mortos em cada um desses intervalos. Quando observadas as incubações das larvas a 35°C, percebe-se também uma significativa diferença entre os valores de UFC/mL e semelhante intervalo de mortes na curva de sobrevivência, marcada por 1 dia de sobrevivência a mais para as larvas inoculadas com H99.

Além disso, comparando o número de UFC/mL e a curva de sobrevivência de cada inoculação em suas respectivas temperaturas de incubação, nota-se uma aparente afirmação de que a morte foi mais rápida devido ao elevado número de células fúngicas na hemolinfa das larvas, porém, isso não deve ser creditado, pois há oscilação no número de colônias crescidas nas placas de petri com meio Ágar Niger e cada larva pode responder com mais ou menos resistência ao mesmo isolado fúngico. Adicionalmente, o gráfico mostra que a produção de

UFC nas larvas infectadas com H99 e incubadas a 35ºC foi mais elevada que nas larvas infectadas com H99 e incubadas a 25ºC, correspondendo à curva de sobrevivência a qual mostra as larvas a 25ºC sobrevivendo mais dias. Por outro lado, para R265, a quantidade de UFC foi contrária à curva de sobrevivência (a 25ºC apresentou o valor de UFC/mL mais elevado e sobreviveu mais dias que a 35ºC), confirmando que a alta concentração de células fúngicas na hemolinfa das larvas não representa exatamente qual ocasião matou mais rápido.

Os resultados obtidos neste estudo são consistentes com evidências experimentais que demonstram o elevado potencial de virulência do isolado R265. Fraser e colaboradores, em 2005, por meio de análises filogenéticas multilocus, demonstraram que os isolados associados ao surto de criptococose da Ilha de Vancouver pertenciam predominantemente ao grupo molecular VGII, sendo R265 representante do genótipo majoritário associado ao surto. Além disso, em modelo murino de infecção por inalação, a cepa R265 apresentou virulência significativamente maior que H99 ($P < 0,01$), também com poucos dias de diferença . Esses achados são corroborados por Ngamskulrungroj et al., 2012, que compararam diretamente H99 e R265 em modelo murino e observaram que o isolado de *C. gattii* apresentou maior crescimento nos pulmões e levou à morte dos animais mais rapidamente, enquanto o isolado de *C. neoformans* apresentou maior crescimento no cérebro e esteve associado à meningoencefalite fulminante. Dessa forma, a maior mortalidade e a maior carga de UFC/mL observadas nas larvas de *T. molitor* infectadas com R265 são compatíveis com o fenótipo de elevada virulência e maior capacidade de proliferação dessa cepa descrito anteriormente, embora a intensidade e a manifestação da virulência possam variar de acordo o modelo experimental utilizado.

Em relação aos peptídeos antimicrobianos, após a aplicação dos filtros na lista da revisão de Zhou et al., 2024, foram selecionados 29 códigos genéticos entre os 247 disponibilizados (Quadro 1).Depois de realizar o comando “tblastx” no genbank do NCBI para encontrar AMPs homólogos no genoma de Tenebrio molitor, foi visto que muitos dos genes AMPs de insetos caracterizados como antifúngico na lista de Zhou et al., 2024 não apresentam similaridade com os genes de *T. molitor*.

O outro resultado obtido durante o blast foi que os genes AMPs presentes no *T. molitor* homólogos aos genes presentes na lista se resumem a: attacin-A-like, attacin 2, attacin 1b, attacin 1a, coleoptericin A, coleoptericin b, coleoptericin C, tenecin 4 e tenecin 1. Visto que para cada “tblastx” de cada código genético selecionado houve mais de um homólogo semelhante no *Tenebrio molitor*, foi feito o alinhamento da sequência de nucleotídeos no programa MEGA6 a fim de não repetir os AMPs e, consequentemente, os primers.

A partir da definição da sequência dos AMPs homólogos em *T. molitor*, os primers foram desenhados no site Primer3Plus e foi definido 1 sequência sense e 1 sequência antisense para cada primer. O resultado do desenho pode ser observado no Quadro 2.

Para confirmar a viabilidade dos primers e se houve amplificação das regiões específicas para a qual foram desenhados, realizou-se uma PCR comum utilizando a GoTaq G2 hotstart polimerase e o cDNA da larva de *Tenebrio molitor* ainda não infectada. Além desse cDNA, outros 3 DNAs produzidos anteriormente em outro trabalho do grupo também foram utilizados. Como mostrado nas Figuras 3, 4 e 5, o resultado encontrado foi que todos os 8 primers amplificaram os cDNAs denominado L2 (armazenado no laboratório) e LetRP (produzido previamente a PCR com o Random Primer da biosystems da Thermo Fisher Scientific) das larvas de *T. molitor*, visto que as bandas dos primers ficaram entre 90 e 150 pares de base quando comparadas ao marcador DNA Ladder de 100bp da GeneDirex ao final da eletroforese.

Ao analisar os artigos publicados sobre os AMPs, em especial os sintetizados por insetos, é possível observar o grande foco no estudo da ação antibacteriana contra Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto os fungos são pouco pesquisados, patogênicos humanos ou entomopatogênicos. As Attacins 1, 2, 1a e 1b mostraram ter ação antifúngica contra o entomopatógeno Beauveria bassiana, ação antibacteriana contra a Gram-negativa *E. coli* – principalmente através do aumento da regulação da Via Spätzle – e regulação na infecção por *C. albicans* por meio da Via TmIMD (Qi et al., 2026; An; Jiang; Kanost, 2010; Jo et al., 2019). As Coleoptericins apresentaram ação antibacteriana contra Gram-positivas (*S. aureus* e *S. haemolyticus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*), e ação antifúngica contra *B. bassiana* (Bulet et al., 1991; Wang et al., 2024; Qi et al., 2026).

Ademais, um importante experimento realizado por Wang et al., 2024 constatou que o rZa-colB, AMP sintetizado a partir da amplificação do gene do cDNA de *Zophobas atratus* com o AMP Coleopterin B do mesmo inseto, tem ação antibacteriana regulando o crescimento do patógeno *K. pneumoniae* e aliviando a mastite nos pulmões de murinos.

Além dessas famílias de peptídeos, o artigo de Imamura et al., 1999 mostrou que as Acaloleptins A1, A2 e A3 do coleoptera *Acalolepta luxuriosa* possuem atividade contra algumas Gram-negativas (não foi achado trabalhos falando sobre a Acaloleptin A-like, mas deve apresentar atividade à microrganismos semelhantes).

Por fim, as Tenecins (1, 2, 3, 4), encontram-se como os principais alvos de estudos de atividade antimicrobiana. As Tenecins 1, 2 e 4 apresentam principalmente atividades antibacterianas contra Gram-positivas e Gram-negativas (Lee et al., 1998 ; Chae et al., 2012; El Shazely e Rolff, 2025). Já a Tenecin 3 é um AMP com potencial papel antifúngico evidenciado para *Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico (Maistrou et al., 2018), e para o patógeno *Sporothrix schenckii* – juntamente com o AMP Thaumatin-like 1 – (Naliato et al., 2025).

Observando que muitos AMPs estudados com ação ou regulação antibacteriana e antifúngica são provenientes de diversas espécies de insetos, como *Galleria mellonella, Manduca sexta, Monochamus alternatus* e *Zophobas atratus*, este trabalho obteve resultados positivos ao triar a lista da revisão de Zhou et al., 2024

e encontrar genes homólogos em *Tenebrio molitor* – um modelo de inseto crescente na pesquisa e de longo uso no nosso laboratório – que, mesmo não estando sobre a ação do patógeno *Cryptococcus* spp., são sintetizados constantemente na hemolinfa do animal e puderam ser visualizados na eletroforese após a PCR.

Como o teste dos primers desenhados não foi realizado com o cDNA de uma larva infectada, não é possível discutir a ação regulatória ou antifúngica dos peptídeos antimicrobianos, portanto, essa etapa será realizada em um novo projeto de pesquisa a partir da análise de qPCR com cDNA de grupos de *T. molitor* inoculados com PBS, cepa H99 e cepa R265 incubados por 12 e 24h a 25°C e 35°C.

Conclusão

Apesar de a espécie Galleria mellonella estar mais consolidada como modelo experimental de invertebrado, o Tenebrio molitor teve um elevado crescimento no estudo da virulência de diversos fungos nos últimos anos. Entre as décadas de 2000 e o início da década de 2010, T. molitor era mais utilizado no estudo de fungos entomopatogênicos e fitopatogênicos. Posteriormente, a partir de 2018, houve um grande aumento no uso das larvas desses coleópteros para estudo da virulência e de antifúngicos de patógenos humanos, como Candida spp., Cryptococcus spp. e Fusarium oxysporum.
Assim, este trabalho teve como objetivo ampliar o estudo de T. molitor como modelo de infecções fúngicas, desde a análise de sua sobrevivência em diferentes controles (grupos SF/SI, Furo, Salina e PBS) até a avaliação da síntese de peptídeos antimicrobianos, os quais terão sua expressão avaliada frente a infecção por Cryptococcus spp. futuramente.
Conclui-se então que o processo de inoculação é um estresse para as larvas, porém, a incubação prolongada a uma temperatura mais elevada que 30º impacta na sobrevivência destes animais, devendo ser considerada durante os experimentos. Também confirmou-se o uso do PBS como melhor inóculo de controle, quando comparado a salina 0,85%.
A curva de sobrevivência, tanto a 25ºC quanto a 35ºC, resultou na morte mais rápida das larvas inoculadas com R265 (C. gattii), concordando com os resultados da literatura os quais afirmam maior virulência desta cepa em comparação à H99 (C. neoformans). Os resultados obtidos a partir da Recuperação de UFC também evidenciam a maior virulência de R265 em relação a H99, visto o maior número de colônias contabilizadas em ambas as temperaturas.
Embora os valores de UFC confirmem a infecção mais acentuada do isolado de C. gattii, eles não apresentam consistência em relação às temperaturas, pois enquanto houve maior número de colônias no recuperado das larvas a 35ºC para H99, o maior número de colônias para R265 foi observado no recuperado das larvas incubadas a 25ºC. Isso pode ser explicado pelos diferentes caminhos de proliferação e manifestação realizados por cada cepa.
Quanto aos genes dos peptídeos antimicrobianos, todos os primers desenhados tiveram resultado positivo, amplificação com cDNA da larva controle (sem

inoculação fúngica) de T. molitor, após a PCR. Dessa forma, tais AMPs mostraram ser continuamente expressos e sua provável expressão aumentada na presença do patógeno será analisada no próximo plano de trabalho através da análise de expressão com cDNA das larvas infectadas com H99 e R265 a 25ºC e 35ºC.
Portanto, conseguindo analisar a expressão e a regulação dos AMPs (Tenecins, Attacins, Coleoptericins e Acaloleptin) de Tenebrio molitor frente a infecção por C. neoformans e C. gattii a partir da análise dos dados da qPCR, será possível analisar o nível de efeito desses peptídeos contra o fungo, seu uso em coquetéis e expressão frente à outras espécies fúngicas patogênicas de importância mundial.

Referências

AN, Chunju; JIANG, Haobo; KANOST, Michael R. Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, Manduca sexta. The FEBS journal, v. 277, n. 1, p. 148–62, Jan. 2010.

BULET, P. et al. Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 36, p. 24520–24525, Dec. 1991.

CHAE, Jun-Ho et al. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle Tenebrio molitor. Developmental & Comparative Immunology, v. 36, n. 3, p. 540–546, Mar. 2012.

DAO, Aiken et al. Cryptococcosis-a systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. Medical mycology, v. 62, n. 6, p. myae043, 27 June 2024.

DEKKEROVÁ-CHUPÁČOVÁ, Jaroslava et al. Up-Regulation of Antimicrobial Peptides Gallerimycin and Galiomicin in Galleria mellonella Infected with Candida Yeasts Displaying Different Virulence Traits. Mycopathologia, v. 183, n. 6, p. 935–940, 1 Nov. 2018.

DE SOUZA, Patrícia Canteri et al. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: Tenebrio molitor. Journal of Fungi, v. 4, n. 4, p. 125, 12 Nov. 2018.

DE SOUZA, Patrícia Canteri et al. Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. Journal of Microbiological Methods, v. 118, p. 182–186, Nov. 2015.

FRASER, James A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island Cryptococcus gattii outbreak. Nature, v. 437, n. 7063, p. 1360–1364, Oct. 2005.

HUAN, Yuchen et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Frontiers in Microbiology, v. 11, 16 Oct. 2020.

IMAMURA, Morikazu et al. Acaloleptins A: Inducible antibacterial peptides from larvae of the beetle, Acalolepta luxuriosa. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 40, n. 2, p. 88–98, 1999.

JANG, Ho Am et al. Bacterial but not fungal challenge up-regulates the transcription of Coleoptericin genes in Tenebrio molitor. Entomological Research, v. 50, n. 9, p. 440–449, 14 Aug. 2020.

JANG, Ho Am et al. Current Status of Immune Deficiency Pathway in Tenebrio molitor Innate Immunity. Frontiers in Immunology, v. 13, 4 July 2022.

JO, Yong Hun et al. Regulation of the expression of nine antimicrobial peptide genes by TmIMD confers resistance against Gram-negative bacteria. Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 10138, 12 July 2019.

KORDACZUK, Jakub et al. Cationic protein 8 plays multiple roles in Galleria mellonella immunity. Scientific Reports, v. 12, n. 1, p. 11737, 11 July 2022.

LEE, K. H. et al. Identification and characterization of the antimicrobial peptide corresponding to C-terminal beta-sheet domain of tenecin 1, an antibacterial protein of larvae of Tenebrio molitor. The Biochemical journal, v. 334 (Pt 1), n. Pt 1, p. 99–105, 15 Aug. 1998.

LI, Xin et al. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. Molecules, v. 27, n. 9, p. 2675, 1 Jan. 2022.

MA, Xu et al. A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. Fermentation, v. 10, n. 11, p. 540–540, 23 Oct. 2024.

MAKAROVA, Olga et al. Antimicrobial defence and persistent infection in insects revisited. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, v. 371, n. 1695, p. 20150296, 26 May 2016.

MANNIELLO, M. D. et al. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. Cellular and Molecular Life Sciences, 17 Feb. 2021.

NALIATO, Georggia Fátima Silva et al. Virulence assessment of Sporothrix species from clinical and environmental clades using Tenebrio molitor as an experimental model. Medical Mycology. v. 63, n. 11, Novembro 2025.

NGAMSKULRUNGROJ, Popchai et al. The Primary Target Organ of Cryptococcus gattii Is Different from That of Cryptococcus neoformans in a Murine Model. mBio, v. 3, n. 3, 8 May 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, Nelson G et al. Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications. Nature Reviews Microbiology, v. 23, p. 687–700, 11 July 2025.

PETRONIO PETRONIO, Giulio et al. Emerging Evidence on Tenebrio molitor Immunity: A Focus on Gene Expression Involved in Microbial Infection for Host-Pathogen Interaction Studies. Microorganisms, v. 10, n. 10, p. 1983, 7 Oct. 2022.

QI, Zhixian et al. Chemosensory proteins-mediated immune response to Beauveria bassiana infection in Monochamus alternatus. Insect Science, 19 Jan. 2026.

RAJASINGHAM, Radha et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. The Lancet. Infectious diseases, v. 22, n. 12, p. 1748–1755, Dec. 2022.

RATHORE, Sudarshan Singh et al. A holistic review on Cryptococcus neoformans. Microbial Pathogenesis, v. 166, p. 105521, May 2022.

RODRIGUES, Milena Izabel Dos Santos et al. Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host for the study of pathogenicity in Candida auris. Microbial pathogenesis, v. 198, p. 107115, Jan. 2025.

SOWA-JASIŁEK, Aneta et al. Antifungal Activity of Anionic Defense Peptides: Insight into the Action of Galleria mellonella Anionic Peptide 2. International journal of molecular sciences, v. 21, n. 6, p. 1912, 11 Mar. 2020.

TINDWA, Hamisi et al. Cloning, Characterization and Effect of TmPGRP-LE Gene Silencing on Survival of Tenebrio Molitor against Listeria monocytogenes Infection. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 11, p. 22462–22482, 14 Nov. 2013.

WANG, Xue et al. A novel glycine-rich peptide from Zophobas atratus, coleoptericin B, targets bacterial membrane and protects against Klebsiella pneumoniae-induced mastitis in mice. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 79, n. 2, p. 417–428, February 2024 .

YANG, Longbing et al. Novel antimicrobial peptide DvAMP serves as a promising antifungal agent against Cryptococcus neoformans. Bioorganic Chemistry, v. 138, p. 106679, Sept. 2023.

ZAVALA, Sofia; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, v. 41, n. 01, p. 069–079, 30 Jan. 2020.

ZHAO, Youbao et al. Cryptococcus neoformans, a global threat to human health. Infectious Diseases of Poverty, v. 12, n. 1, 17 Mar. 2023.

ZHOU, Lizhen et al. Insect Antimicrobial Peptides as Guardians of Immunity and Beyond: A Review. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 7, p. 3835–3835, 29 Mar. 2024.

Anexos



Figura 1 - Curva de Sobrevivência realizada para definir o grupo controle e comprovar a morte de espécimes mesmo com inoculação de PBS. SF/SI representa o grupo de larvas que não sofreram inoculação ou furo; Furo representa as larvas que sofreram o furo d



Figura 2 - Curva de Sobrevivência de Tenebrio molitor inoculado com 2 isolados de Cryptococcus. As larvas foram inoculadas com 5uL de PBS (grupo controle), do isolado H99 (C. neoformans) e do isolado R265 (C. gattii), os dois últimos na concentração 2x105



Figura 3 - Gráfico de Recuperação das Unidades Formadoras de Colônia de larvas de Tenebrio molitor. As larvas foram inoculadas com 5uL de PBS (grupo controle), do isolado H99 (C. neoformans) e do isolado R265 (C. gattii). A hemolinfa da larva foi semeada



Quadro 1 - Genes AMPs selecionados para verificação da homologia com genes do T. molitor.



Quadro 2 - Primers construídos para avaliar a homologia com AMPs de T. molitor neste trabalho.



Figura 4 - Resultado da PCR com os primers Tenecina 1 (.1), Coleoptericina C (.2) e Coleoptericina B (.3). O primeiro poço contém o marcador DNA Ladder de 100bp e CN indica os controles negativos dos MIX. Let e LetRP correspondem aos cDNAs produzidos dura



Figura 5 - Resultado da PCR com os primers Coleoptericina A (.4), Tenecina 4 (.5) e Acaloleptin A-like (.6). O primeiro poço contém o marcador DNA Ladder de 100bp e CN indica os controles negativos dos MIX. Let e LetRP correspondem aos cDNAs produzidos du



Figura 6 - Resultado da PCR com os primers Attacin 1b (.7) e Attacin 1a (.8). O primeiro poço contém o marcador DNA Ladder de 100bp e CN indica os controles negativos dos MIX. Let e LetRP correspondem aos cDNAs produzidos durante este trabalho com os prim

CÓDIGO: SB1682

AUTOR: HELENA LARA BARROS DE SOUZA

ORIENTADOR: DANIEL MARQUES DE ALMEIDA PESSOA

TÍTULO: Caracterização cromática da população de macrofungos na Mata dos Saguis da UFRN

Resumo

Os organismos do reino Fungi apresentam uma diversidade quase imensurável, com grandes variações de morfologia, coloração, odor e modo de dispersão, que lhes confere notório potencial para estudos ecológicos. O papel adaptativo da coloração dos fungos é um dos aspectos menos explorados em estudos sobre características morfológicas, com poucos trabalhos que citam sua possível relação com a atração de dispersores ou a sinalização aposemática. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a coloração dos macrofungos encontrados na Mata dos Saguis da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), por meio de uma abordagem objetiva e quantitativa baseada em espectrofotometria de refletância. Entre outubro de 2025 e junho de 2026, coletamos, registramos, fotografamos e analisamos espectralmente 39 corpos de frutificação pertencentes a diferentes grupos de Basidiomycota e Ascomycota. A análise dos espectros de refletância mostrou assinaturas espectrais distintas entre as amostras, o que reflete a diversidade cromática do grupo no local. Os resultados fundamentam a construção de um catálogo fotográfico preliminar das espécies encontradas ao evidenciar que a coloração dos macrofungos da Mata dos Saguis é heterogênea e passível de caracterização objetiva.

Palavras-chave: Coloração fúngica, Espectrofotometria, Ecologia sensorial, Macrofungos

TITLE: Chromatic characterization of the macrofungal population in Mata dos Saguis at UFRN

Abstract

Organisms of the kingdom Fungi exhibit an almost immeasurable diversity, with a wide range of morphology, coloration, odor, and dispersal mode, which grants them notable potential for ecological studies. The adaptive role of fungal coloration is one of the least explored aspects in studies on morphological characteristics, with few works citing its possible relationship to attracting

dispersers or aposematic signaling. This study aimed to characterize the coloration of macrofungi found in Mata dos Saguis of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), through an objective and quantitative approach based on reflectance spectrophotometry. Between October 2025 and June 2026, we collected, recorded, photographed, and spectrally analyzed 39 fruiting bodies belonging to different groups of Basidiomycota and Ascomycota. Analysis of the reflectance spectra showed distinct spectral signatures among the samples, reflecting the chromatic diversity of the group at the site. Results provide a basis for building a preliminary photographic catalog of the species found, showing that coloration of macrofungi in Mata dos Saguis is heterogeneous and amenable to objective characterization.

Keywords: Fungal coloration, Spectrophotometry, Sensory ecology, Macrofungi

Introdução

Os fungos apresentam uma diversidade monumental, com uma estimativa de que haja cerca de 3,8 milhões de espécies na natureza (HAWKSWORTH; LUCKING, 2017). Há grande variação na forma, na cor, no cheiro e no modelo de dispersão desses organismos, cujo potencial para o estudo ecológico é notório (HALBWACHS; SIMMEL; BASSLER, 2016). Embora poucos trabalhos discorram sobre a importância da morfologia para as interações ecológicas desse grupo, essas características têm grande influência na forma como as relações interespecíficas ocorrem (VIOLLE et al., 2007).

Uma das principais formas de interação entre fungos e outras espécies se dá via dispersão dos esporos (BODDY; JONES, 2008). Enquanto alguns fungos têm dispersão ativa e independem de fatores externos para disseminar seus esporos, outros desenvolveram mecanismos adaptativos variados, como esporos adaptados à água e ao ar ou, até mesmo, a dispersão por meio de outros organismos (MAGYAR; VASS; LI, 2016). Muitos fungos que dependem da dispersão por animais se utilizam de atrativos, como a emissão de sinais químicos específicos, para aproximar dispersores (DAVIS et al., 2013; HUNG; LEE; BENNETT, 2015).

A coloração é outro fator que pode ter influência na dispersão dos fungos, uma vez que, enquanto alguns grupos apresentam colorações conspícuas e mais chamativas, outros possuem colorações crípticas e mais assemelhadas às cores do substrato onde crescem. Em basidiomicetos lamelados, por exemplo, as cores vibrantes podem estar associadas ao aposematismo, uma maneira de evitar o consumo por predadores via sinalização de toxicidade (HALBWACHS; SIMMEL; BASSLER, 2016). No entanto, poucos trabalhos exploram a funcionalidade e a importância ecológica dessas características. A luz atua como um sinal fundamental para a regulação biológica dos fungos, interferindo na formação de estruturas reprodutivas e na síntese de pigmentos (BRINO et al., 2010).

Em Basidiomycetos, a percepção luminosa é mediada por fotorreceptores que regulam vias associadas ao desenvolvimento, à morfogênese e à produção de

metabólitos secundários, incluindo pigmentos de proteção contra danos celulares. (BRINO et al., 2010; TUDESQUI; SILVA, 2022). Entender como a síntese de pigmentos nos corpos frutificação varia de acordo com fatores abióticos, como incidência de luz, reforça a relevância de se compreender o papel adaptativo da coloração em macrofungos. Em razão da quantidade insuficiente de trabalhos desenvolvidos nesta área, a investigação aprofundada do papel adaptativo da coloração dos fungos é necessária, principalmente para compreensão das relações com dispersores e visitantes indesejados. Compreender a relação entre a coloração e os modos de dispersão dos fungos pode fornecer ideias importantes sobre a ecologia desses organismos e suas estratégias evolutivas.

O presente trabalho teve como objetivo geral registrar e catalogar a coloração dos macrofungos que ocorrem na Mata dos Saguis da UFRN. Os objetivos específicos compreendem coletar e identificar exemplares encontrados, para listar espécies de fungos que ocorrem na área; fotografar e mensurar a coloração dos fungos encontrados com auxílio de um sistema de espectrofotometria, para caracterizar fisicamente a coloração de cada espécie; e, a partir dessas informações, construir um catálogo fotográfico de fungos para a Mata dos Saguis.

Metodologia

Área de estudo

A pesquisa foi realizada na Mata dos Saguis, uma área de fragmento de mata dentro do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. A área caracteriza-se por apresentar vegetação típica de Mata Atlântica em ambiente urbano, com presença de troncos caídos, serapilheira e substrato arenoso, que constituem micro-habitats favoráveis ao desenvolvimento de macrofungos.

Coleta de material

A Mata dos Saguis foi visitada semanalmente entre outubro e novembro de 2025 e entre março e junho de 2026, para busca ativa de fungos. Em períodos mais secos a mata foi visitada de uma a duas vezes por semana. Após a ocorrência de chuvas intensas ou prolongadas as visitas foram intensificadas e as coletas ocorreram de três a quatro vezes por semana. Os espécimes foram fotografados in loco e coletados com auxílio de pá, canivete e luvas, seguindo protocolo de coleta adaptado (PUTZKE, 2002).
Os basidiomas foram acondicionados em potes plásticos e transportados imediatamente para o laboratório, onde foram acomodados em placas de Petri e levados para a sala de espectrofotometria.

Fotografia digital

Após o avistamento, cada fungo foi fotografado in loco, sempre ao lado de uma cartela de cores (X-Rite ColorChecker, Pantone), de forma a permitir que as fotos produzidas pudessem ser calibradas para refletir as cores reais da natureza. As fotografias foram realizadas com uma câmera digital SRL (T2i 18 megapixel, Canon Inc.), seguindo o protocolo adaptado para captura de imagens de macrofungos (BITTENCOURT et al., 2022).

Espectrofotometria

Após serem fotografados, os fungos foram coletados com cuidado e levados ao Laboratório de Ecologia Sensorial da UFRN, onde tiveram seus espectros de refletância mensurados com auxílio de um espectrofotômetro (USB4000-UV-VIS, Ocean Optics). As medições realizadas com o espectrofotômetro foram não invasivas e não induziram danos ao material coletado. Informações sobre o cheiro e a consistência apresentados por cada espécime também foram registradas. Dada a dificuldade de acesso a equipamentos adequados para secagem e armazenamento, após ter o espectro de refletância registrado cada espécime foi devidamente descartado.
Os pontos onde foram medidos os espectros de refletância variaram de acordo com o aspecto de cada corpo de frutificação. Ascomas que apresentaram uma única cor aparente tiveram um único ponto medido. Basidiomas lamelados com uma única cor aparente tiveram dois pontos medidos (píleo e lamelas). Ascomas com mais de uma cor aparente tiveram um ponto de medida correspondente para cada cor identificável. Basidiomas com mais de uma cor aparente tiveram três pontos medidos ou mais, a fim de comparar as características físicas das cores observadas (píleo, himênio e manchas de cores diferentes). As medidas não seguiram um padrão fixo e os pontos onde a refletância foi medida em cada fungo foram distintos, adaptados de acordo a morfologia e o padrão de coloração de cada espécime. Essa forma de coleta de dados gerou, para cada ponto medido, um gráfico que ilustra características físicas da cor (refletância e comprimento de onda) e mostra quanto de luz o cogumelo reflete em cada comprimento de onda.

Catálogo

Com base nas informações coletadas, além de informações da literatura e das fotos registradas, foi construído um protótipo de catálogo fotográfico para a Mata dos Saguis, utilizando como modelo a amostra *Pycnoporus sanguineus*. O protótipo integra fotografias artísticas, feitas em campo com câmera digital, descrições morfológicas e os espectros de refletância. Esse modelo servirá de base para a versão completa do catálogo, que contemplará as demais espécies registradas e informações importantes sobre cada fungo.

Resultados e Discussões

Resultados

Ao longo do período de estudo foram registrados, fotografados e analisados espectralmente 39 corpos de frutificação de macrofungos na Mata dos Saguis da UFRN, pertencentes aos filos Basidiomycota e Ascomycota. A maior parte dos espécimes coletados apresentava hábito lignícola, ou seja, ocorria sobre troncos caídos, cascas de árvores e raízes expostas, sendo também registrados espécimes terrícolas e sobre serapilheira. Entre as amostras, foi possível identificar, com diferentes níveis de confiança, as seguintes espécies: *Hexagonia hydnoides* (Polyporaceae), *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae), *Ganoderma sp.* (Ganodermataceae) e *Leucocoprinus birnbaumii* (Agaricaceae).
Alguns espécimes que foram classificados apenas até o nível de filo (Ascomycota) destacaram-se por morfologias do tipo dedo ou chifre (estromas alongados e recurvados), sugestivas de representantes da ordem Xylariales, possivelmente do gênero *Xylaria*. Também foram registrados espécimes cuja morfologia sugere outros representantes da ordem Polyporales e das famílias Amanitaceae e Agaricaceae. Essas amostras ainda não foram identificadas a nível de espécie.
A análise das medidas espectrais evidenciaram grande diversidade cromática. As colorações registradas em campo incluem tons suaves e mais discretos, como bege, branco-acinzentado, cinza, vinho e marrom, e colorações intensas e potencialmente conspícuas, como laranja, amarelo, rosa e branco. Além de tons azulados incomuns e padrões com múltiplas cores no mesmo corpo de frutificação.

Espectros de refletância

Nossos resultados indicam que diferentes partes de um mesmo corpo de frutificação podem exibir assinaturas espectrais distintas, como registrado em espécimes com zonas de cores variadas. Em Ascomycota NI05 (*Xylaria sp.*), por exemplo, o ponto creme da base (Figura 1), o ponto escuro do ápice (Figura 2) e a base branca do estroma (Figura 3) apresentam curvas espectrais claramente diferentes. O ponto creme reflete pouca luz e é levemente amarelado, a curva mostra refletância moderada e ascensão gradual na faixa amarela do espectro visível, enquanto o ponto escuro exibe valores de refletância inferiores e coerentes com a pigmentação escura e a absorção significativa de luz. A base branca registra os maiores níveis de refletância, com pico entre 400 e 700 nm. A separação entre essas três curvas confirma que a coloração do estroma não é homogênea e que cada zona possui assinatura cromática própria.
Na amostra de *Pycnoporus sanguineus*, o espectro do píleo laranja uniforme mostra refletância elevada nas faixas do laranja e do vermelho, com pico pronunciado entre 580 e 650 nm, aproximadamente. Além de refletância sutil na faixa ultravioleta, com pico entre, aproximadamente, 300 e 380 nm (Figura 4). A comparação entre o perfil de baixa refletância e alta variabilidade de Xylariales (Ascomycota NI05) e o perfil de alta refletância concentrada de *Pycnoporus sanguineus* comprova a riqueza cromática da comunidade. Esses

dados brutos sustentam ainda a interpretação de que a cor dos corpos de frutificação não é apenas traço morfológico, mas característica quantificável.

Amostras detalhadas

Ascomycota NI05 - Substrato: tronco em decomposição; Cor no campo: branco/creme/cinza/preto; 2 indivíduos; consistência gelatinosa. Apresentou estruturas em forma de dedo ou chifre, alongadas e recurvadas, com ápice enegrecido e base esbranquiçada a creme. A morfologia é fortemente sugestiva de *Xylaria sp.* (Xylariaceae, Xylariales). Os três pontos medidos (creme, escuro, base branca) apresentam curvas distintas, coerentes com a variação de coloração observável ao longo do estroma.

Ascomycota NI06 - Substrato: tronco em decomposição; Cor no campo: branco acinzentado; 4 indivíduos; consistência firme. Estruturas em forma de fita/chifre contorcido, totalmente esbranquiçadas a branco-acinzentadas, com superfície pruinosa coberta de esporos liberados em nuvem. Sugere a hipótese de estágio de maturação diferente de NI05 no mesmo gênero (*Xylaria sp.*).

Ascomycota NI30 - Substrato: tronco em decomposição; Cor no campo: branco acinzentado; 1 indivíduo; consistência firme. Estruturas em forma de chifre, cinza-esbranquiçadas, emergindo de madeira muito decomposta, em estágio imaturo. Morfologia semelhante às amostras NI05 e NI06, possivelmente o mesmo gênero (*Xylaria sp.*) em estágio mais jovem.

Pycnoporus sanguineus - Substrato: tronco no solo; Cor no campo: laranja; 7 indivíduos; consistência firme. Píleo flabeliforme a semicircular, séssil, de coloração laranja vívida e uniforme, com textura lisa a levemente aveludada e zonas concêntricas sutis. A curva no gráfico mostra refletância elevada entre 600 e 700 nm, coerente com a percepção visual da cor laranja intensa.

Catálogo fotográfico

Com base nos dados coletados, foi construído um protótipo de catálogo fotográfico para a Mata dos Saguis (Figura 5), utilizando como modelo a amostra *Pycnoporus sanguineus*. O protótipo integra fotografias artísticas, feitas em campo com câmera digital, descrições morfológicas e os espectros de refletância. Esse modelo servirá de base para a versão completa do catálogo, que contemplará as demais espécies registradas e informações importantes sobre cada fungo.

Discussão

A coloração dos macrofungos da Mata dos Saguis revelou-se heterogênea e conspícua, com predomínio de hábito lignícola e grande variação cromática entre os espécimes. Essa diversidade é coerente com o que se observa para

macrofungos em florestas tropicais, onde a coloração dos corpos de frutificação pode desempenhar papéis ecológicos importantes, como a atração de dispersores e a sinalização aposemática (HALBWACHS; SIMMEL; BASSLER, 2016). A ocorrência de espécimes com colorações intensas (laranja, amarelo, rosa, vinho) e de padrões espectrais distintos reforça a hipótese de que a cor não é meramente um caráter taxonômico, mas um traço funcional relevante (VIOLLE et al., 2007).

A literatura indica que a produção de pigmentos em fungos é regulada por fatores ambientais e genéticos, sendo a luz um dos principais sinais que modulam a síntese de metabólitos secundários, como pigmentos de proteção e de atração (BRINO et al., 2010; TUDESQUI; SILVA, 2022). Nossos resultados indicam que diferentes partes de um mesmo basidioma podem exibir assinaturas espectrais distintas, como registrado em espécimes com zonas de cores variadas. Em Ascomycota NI05 (*Xylaria sp.*), por exemplo, o ponto creme da base (Figura 1), o ponto escuro do ápice (Figura 2) e a base branca do estroma (Figura 3) apresentam curvas espectrais claramente diferentes, sugerindo uma regulação localizada e funcional dos pigmentos. Essa variação interna pode estar relacionada a diferentes funções em cada região do corpo de frutificação, como a sinalização visual direcionada a visitantes ou a proteção contra radiação (KRAH et al., 2019).

Em Pycnoporus sanguineus , a coloração laranja vivida registrou refletância moderada na faixa do ultravioleta e elevada nas faixas de laranja e vermelho (Figura 4), o que pode indicar relevância da cor tanto para a atração de dispersores quanto para a função fotoprotetora. A literatura indica que a exposição a luz solar pode influenciar a coloração dos corpos de frutificação dos fungos através da atuação de pigmentos, como carotenoides e melanina, na absorção de radiação UV (YOKOMIZO; NAKAMURA, 2022). A abordagem de análise espectrofotométrica adotada permite quantificar essa variação de forma objetiva e reprodutível.

A diversidade de colorações, o hábito predominantemente lignícola e as curvas espectrais obtidas evidenciam que a Mata dos Saguis abriga uma comunidade de macrofungos cromaticamente diversa, passível de caracterização objetiva. Embora a identificação taxonômica completa exija análises complementares, como microscopia de esporos e, quando possível, análise molecular, a abordagem utilizada demonstrou potencial para fundamentar estudos ecológicos sobre o papel adaptativo da cor nesse grupo.

Conclusão

Esse trabalho permitiu caracterizar, de forma objetiva e quantitativa, a coloração dos macrofungos da Mata dos Saguis da UFRN. Foram registrados 39 corpos de frutificação, pertencentes a Basidiomycota e Ascomycota, com identificação parcial de quatro espécies (*Hexagonia hydnoides*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma sp.* e *Leucocoprinus birnbaumii*) e grande diversidade cromática. Os dados obtidos fundamentam a construção posterior de um

catálogo fotográfico, cujo protótipo foi elaborado com base na amostra *Pycnoporus sanguineus* (Figura 5).

A análise espectral reforça o potencial funcional da coloração fúngica ao revelar assinaturas cromáticas distintas entre as amostras e entre diferentes regiões do mesmo basidioma. Algumas restrições foram encontradas durante a execução do trabalho, como a coleta de amostras fotográficas, que ficou incompleta por inviabilidade de acesso ao local. Ademais, a identificação de várias amostras permanece pendente a nível de gênero e requer estudos complementares advindos da continuidade da pesquisa. Mesmo limitados, os resultados fornecem uma base de dados relevantes para entender o papel adaptativo da coloração fúngica e contribuem para futuros estudos sobre a ecologia sensorial e evolutiva dos fungos da região.

Referências

BITTENCOURT, F. et al. Protocolo para captura de imagens de macrofungos. [S.l.]: MIND.Funga, 2022.

BODDY, L.; JONES, T. H. Interactions between basidiomycota and invertebrates. In: BODDY, L.; FRANKLAND, J. C.; VAN WEST, P. (Eds.). Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. London: Academic Press, 2008. p. 125-143.

BRINO, A. L. et al. Effects of light on fruit body color in edible mushrooms: a review. Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 829981, 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.829981.

DAVIS, T. S.; CRIPPEN, T. L.; HOFSTETTER, R. W.; TOMBERLIN, J. K. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. Journal of Chemical Ecology, v. 39, n. 7, p. 840-859, 2013. doi: 10.1007/s10886-013-0306-z.

HALBWACHS, H.; SIMMEL, J.; BASSLER, C. Tales and mysteries of fungal fruiting: how morphological and physiological traits affect a pileate lifestyle. Fungal Biology Reviews, v. 30, n. 2, p. 36-61, 2016. doi: 10.1016/j.fbr.2016.04.002.

HAWKSWORTH, D. L.; LUCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiology Spectrum, v. 5, n. 4, p. 79-95, 2017. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, n. 8, p. 3395-3405, 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6494-4. KRAH, F.-S. et al. European mushroom assemblages are darker in cold climates. Nature Communications, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-10767-z.

MAGYAR, D.; VASS, M.; LI, D. Dispersal strategies of microfungi. In: Biology of Microfungi. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 315-371.

PUTZKE, J. Manual prático de coleta e herborização de macrofungos. Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, 2002.

SILVA, R. A.; PEREIRA, C. B. Regulation of pigment synthesis in Auricularia cornea fruiting bodies. Journal of Fungal Biology, v. 11, p. 1326710, 2023. doi: 10.3389/fevo.2023.1326710.

TUDESQUI, J.; SILVA, M. How fungi see the world: fungal photoreceptors and their role in the regulation of fungal biology. Mycology Today, v. 12, n. 1, p. 45-62, 2022.

VIOLLE, C. et al. Let the concept of trait be functional! Oikos, v. 116, n. 5, p. 882-892, 2007. doi: 10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x.

YOKOMIZO, R.; NAKAMURA, A. Macroclimate and vegetation cover drive variation in fungal brightness. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 10, p. 829981, 2022. doi: 10.3389/fevo.2022.829981.

Anexos



Figura 1 — Curva de refletância luminosa de Ascomycota (Xylaria sp.) para análise de coloração.



Figura 2 — Curva de refletância luminosa de Ascomycota (Xylaria sp.) para análise de coloração.



Figura 3 — Curva de refletância luminosa de Ascomycota (Xylaria sp.) para análise de coloração.



Figura 4 — Curva de refletância luminosa de Pycnoporus sanguineus para análise de coloração



Figura 5 — Modelo de catálogo fotográfico para a Mata dos Saguis (protótipo de elaborado com Pycnoporus sanguineus).

CÓDIGO: SB1688

AUTOR: THOMAS ALBERT SOARES CAMARA

ORIENTADOR: ARRILTON ARAUJO DE SOUZA

TÍTULO: Como Saguis decidem onde, como e quando Forragear: Uma análise integrada de Heurísticas de Movimento.Neste trabalho, nós investigamos como os saguis-de-tufo-branco, Callithrix jacchus, podem utilizar

Resumo

Neste trabalho, nós investigamos como os saguis-de-tufo-branco, Callithrix jacchus, podem utilizar da Heurística para decidirem as melhores rotas por entre as suas manchas de forrageio e em que ordem eles visitam essas manchas. Acompanhamos três grupos sociais com GPS durante 219 dias de campo, de Abril de 2024 a Junho de 2026 na Floresta Nacional de Açu, no Rio Grande do Norte. Reconstruímos 884 deslocamentos entre manchas de alimentação, delimitadas pelo algoritmo DBSCAN, e comparamos três modelos de decisão. O primeiro foi um forrageador sem memória, o qual escolhe o seu destino ao acaso (MRW). O segundo foi a regra do vizinho mais próximo (NN), que escolhe sempre a mancha conhecida mais próxima. O terceiro foi uma versão dessa regra que também considera a época do ano (NN Temporal). A regra do vizinho mais próximo previu os deslocamentos muito melhor do que o acaso (dz = 1,15) e a inclusão da informação temporal trouxe uma melhora pequena, embora significativa (dz = 0,37). Os resultados mostram que C. jacchus usa o que já aprendeu sobre o espaço para organizar trajetos mais econômicos, e que a memória temporal tem um papel secundário nas decisões

Palavras-chave: Cognição espacial, ecologia do movimento, heurísticas de forrageio

TITLE: How Marmosets Decide Where, How, and When to Forage: An Integrated Analysis of Movement Heuristics. In this study, we investigate how common marmosets (*Callithrix jacchus*) may utilize

Abstract

In this study, we investigated how common marmosets (*Callithrix jacchus*) use heuristics to decide on the best routes between foraging patches and the order in which they visit them. We tracked three social groups using GPS over 219 days of fieldwork from April 2024 to June 2026 in the Açu National Forest, Rio Grande do Norte. We

reconstructed 884 movements between feeding patches—delineated using the DBSCAN algorithm—and compared three decision models. The first was a memoryless forager that chooses its destination at random (MRW). The second was the nearest-neighbor rule (NN), which always selects the closest known patch. The third was a version of this rule that also considers the time of year (Temporal NN). The nearest-neighbor rule predicted movements much better than chance (dz = 1.15), and the inclusion of temporal information yielded a small yet significant improvement (dz = 0.37). The results show that *C. jacchus* uses previously acquired spatial knowledge to organize more efficient travel routes and that temporal memory plays a secondary role in decision-making.

Keywords: Spatial cognition, movement ecology, foraging heuristics

Introdução

Forrageamento, um conceito e um comportamento fundamental em que animais vasculham o ambiente ao seu redor para encontrar recursos alimentícios. Ao longo da evolução, várias estratégias diferentes de comportamento foram desenvolvidas para obter tipos diferentes de alimentos (Garcia et al., 2023) e com hábitos alimentares e nichos ecológicos diferentes, cada estratégia pode exigir formas de decisão distintas para como gerenciar rotas alimentícias em seus territórios que possam ser mais recompensadoras, contendo uma maior disponibilidade de alimentos a um baixo custo energético de deslocamento, esse conceito é conhecido como Forrageamento Ótimo (MacArthur; Pianka, 1966). Os primatas são um bom exemplo dessa flexibilidade, pois conseguem ajustar a forma como procuram comida de acordo com as mudanças na quantidade e na distribuição dos recursos (Sen Gupta & Radhakrishna, 2016; Hongo et al., 2018). Entender como esses animais decidem onde se alimentar e em que ordem visitar as manchas de recurso é uma das perguntas centrais da ecologia cognitiva de primatas (Trapanese et al., 2019). O histórico de aprendizado do animal ao longo de sua vida, sobre onde estão concentradas as fontes de alimento, é fundamental para guiar suas rotas a partir de uma regra de decisão chamada Heurística de movimento. A Teoria do Forrageamento Ótimo, como já mencionado, prevê que animal trace rotas que possam otimizar o gasto energético do movimento, porém ela não explica quais regras um animal de fato aplica em ambientes naturais para obter esse benefício (MacArthur & Pianka, 1966). Uma das regras mais estudadas sobre movimento é a do vizinho mais próximo (Nearest Neighbour, NN), a qual testa a preferência do animal pelos menores percursos até o seu próximo destino. Em Chiropotes sagulatus e Gorilla gorilla, essa regra foi testada e pôde explicar boa parte de suas trajetórias, relevando que a economia de esforço pode ter maior valor do que uma rota planejada com antecedência (Shaffer, 2014; Robira et al., 2023). Alguns estudos mais recentes têm investigado se os primatas possuem certas noções sobre sazonalidade e se podem aplicá-las para decidir quando ir à uma mancha de acordo com seu histórico de ocorrência de recursos, o que acrescenta uma restrição temporal à regra do vizinho mais próximo (Robira et al., 2023). A espécie escolhida, Callithrix jacchus, se mostrou um bom modelo para esse estudo devido ao seu principal habitat ser a Caatinga, um ambiente semiárido com estações bem demarcadas, onde qualquer movimento pode ser bastante custoso para o grupo como um todo. Eles possuem uma dieta generalista que inclui seiva de árvore, insetos, frutos, pequenos vertebrados e até ovos, o que permite estratégias mais maleáveis ao longo do ano. Estudos anteriores em cativeiro já revelaram que esses animais possuem memória

espacial (Piza et al., 2024; Sehner et al., 2025) e que utilizam rotas em vida livre (Abreu et al., 2021). A tomada de rotas de C. jacchus durante o forrageio são orientadas por regras de decisão consistentes das quais se utilizam da informação espacial acumulada, ou surgem de processos de busca moldados pela distribuição imediata dos recursos.

Metodologia

Área de estudo O estudo foi realizado na Floresta Nacional de Açu (FLONA de Açu, 5°34'20"S, 36°54'33 'O), no município de Assú, Rio Grande do Norte. A unidade de conservação tem 215,25 ha de vegetação nativa de Caatinga e é administrada pelo ICMBio. A área apresenta alta diversidade de plantas (Paiva et al., 2021). O clima é semiárido, com temperatura média anual entre 26,9 e 29,1 °C e precipitação média de 704 mm por ano. Existem duas estações bem definidas, uma chuvosa (de janeiro a junho) e uma seca (de julho a dezembro) (Climate-Data.org, 2024). Sujeitos e habituação Acompanhamos três grupos sociais de C. jacchus de 3 a 4 dias por semana, depois que os animais já estavam habituados à presença humana. Os indivíduos foram identificados por captura e marcação, usando uma armadilha de gaiola com seis compartimentos acionados separadamente. Após a captura, os animais foram sedados com cetamina (10 mg) e midazolam (0,2 mg/kg, via intramuscular), marcados e soltos no mesmo local depois de se recuperarem. O tamanho dos grupos variou de 2 a 7 indivíduos ao longo do estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo nº 409.049/2024) e pelo SISBIO (licença nº 9488-1). Coleta de dados Os dados foram coletados de abril de 2024 a março de 2025 e de fevereiro a agosto de 2026, totalizando 219 dias de campo e 1.886 horas de observação. As trajetórias diárias foram registradas com GPS (Garmin GPSMAP 65s), que marcava a posição automaticamente a cada 60 segundos, das 05h00 às 17h00. O comportamento alimentar foi anotado pelo método de animal focal, em sessões de 20 minutos com registros a cada 2 minutos. Para cada evento de alimentação, anotamos a espécie do item consumido, uma estimativa visual da quantidade e as coordenadas do local. Delimitação das manchas de forrageio As manchas de forrageio foram definidas pelo algoritmo DBSCAN (raio = 30 m, minPts = 1), aplicado a todos os locais de alimentação de todos os grupos juntos. O raio de 30 m foi escolhido porque combina com a precisão do GPS embaixo da vegetação e com o tamanho real das unidades de recurso usadas pela espécie. Assim, fontes próximas, como árvores de goma, cactos e fruteiras vizinhas, foram tratadas como uma única mancha. Os deslocamentos foram definidos como as transições entre manchas diferentes visitadas em sequência, e o comprimento de cada deslocamento foi calculado pela distância entre os centros das manchas. As áreas de vida foram estimadas pelo Kernel de Densidade (KDE 95/75/50%) sobre as trajetórias completas do GPS. Modelos de heurística espacial e análise estatística Para testar as duas hipóteses, comparamos três modelos de decisão aplicados aos 884 deslocamentos entre manchas. O primeiro foi o MRW (Mere Random Walk), um modelo nulo sem memória espacial, no qual o destino é sorteado ao acaso entre todas as manchas disponíveis (1.000 sorteios por deslocamento). O segundo foi o NN (vizinho mais próximo), que representa um forrageador com memória e escolhe sempre a mancha conhecida mais próxima, sem contar o último local visitado. O terceiro foi o NN Temporal, uma versão do NN que só considera as manchas com histórico de uso em uma janela de tempo de ±15 dias em torno da data do deslocamento. O erro de predição foi calculado como a diferença absoluta entre a distância observada e a esperada, com transformação logarítmica ln(|erro| + 1). As comparações entre modelos

foram feitas com teste t pareado, e o tamanho do efeito foi medido pelo d de Cohen (dz). Todas as análises foram feitas no software R versão 4.3.2 (α = 0,05).

Resultados e Discussões

Manchas de forrageio e área de vida Foram identificadas 418 manchas de forrageio. Dessas, 397 (95,0%) foram usadas por um único grupo social (G1 = 110; G2 = 183; G3 = 104), e as outras 21 (5,0%) foram compartilhadas entre grupos. A área de vida média, estimada por KDE 95%, foi de 11,8 ha (G1 = 13,54 ha; G2 = 12,32 ha; G3 = 9,44 ha). A reconstrução das trajetórias resultou em 931 deslocamentos entre manchas. Depois de remover os 5% maiores comprimentos de passo, que podem indicar erro de GPS, restaram 884 deslocamentos para a análise (G1 = 194; G2 = 447; G3 = 243). H1. Seleção de destino por proximidade espacial A hipótese 1 foi confirmada. O modelo nulo MRW teve o maior erro de predição (mediana = 5,38 ln[m+1]), o que equivale a um erro de cerca de 217 m. A regra do vizinho mais próximo (NN) reduziu bastante esse erro (mediana = 3,70 ln[m+1]; erro de aproximadamente 39 m). A diferença foi grande e significativa ($t(883) = 34,12$; $p < 0,001$; $dz = 1,15$) e apareceu nos três grupos analisados separadamente (G1: $dz = 1,52$; G2: $dz = 0,95$; G3: $dz = 1,34$; todos com $p < 0,001$). Na prática, o NN acertou o destino dentro de 50 m do local real em 55,7% dos deslocamentos. Esse resultado se manteve mesmo quando trocamos a forma do modelo nulo e variamos o alcance de percepção entre 15 e 60 m ($dz = 0,15$ a $0,33$; todos com $p < 0,001$), o que mostra que o achado é robusto. H2. Memória espaço-temporal A hipótese 2 foi parcialmente confirmada. Incluir a restrição temporal (NN Temporal, janela de ±15 dias) reduziu o erro de predição em relação ao NN puramente espacial (mediana = 3,47 ln[m+1]; $t(883) = 10,89$; $p < 0,001$; $dz = 0,37$). Apesar de significativa, essa melhora foi pequena ($dz = 0,37$, contra $dz = 1,15$ do NN sobre o MRW). Isso indica que a proximidade espacial é o fator mais importante nas decisões de destino e que a memória temporal tem um papel apenas complementar.

Discussão
Com os resultados obtidos, foi possível observar que a formação de rotas do Callithrix jacchus não é aleatória, pois o modelo de vizinho mais próximo (NN) foi capaz de prever com muito mais precisão quando comparado ao modelo nulo ($dz = 1,15$) quais seriam as rotas traçadas pelos grupos, localizando o destino com uma margem de 50 metros de proximidade. Isso mostra que a informação geográfica que o animal já tem sobre uma mancha é bastante decisiva para que eles reduzam as distâncias percorridas, sendo uma importante estratégia para reduzir o custo do forrageio em um ambiente semiárido. Esse resultado se reforça por ter sido apresentado pelos 3 grupos acompanhados, e não como um caso de grupo isolado. Ao visitar locais próximos e já conhecidos como uma fonte constante de alimento, pode-se interpretar que estes animais estão reduzindo o esforço da decisão ao optarem pelo seguro em vez de buscar novas fontes desconhecidas. Padrões como esse já são descritos também em outros primatas, específicamente babuínos e gorilas ocidentais; eles organizam suas manchas de forrageio como uma rede de locais conhecidos ligados por relações de vizinhança (Noser & Byrne, 2014; Presotto et al., 2018; Robira et al., 2023). Ainda assim, em parte dos deslocamentos o animal foi além da mancha mais próxima, o que sugere que outros fatores, como o valor de alimento da mancha, também podem influenciar a decisão em algumas situações (Xavier et al., 2024). Apesar da memória temporal ter se mostrado secundária, ela foi significativa ($dz = 0,37$), evidenciando que os saguis também

consideram os fatores sazonais, embora a proximidade ainda seja mais determinante. Esse resultado se apresenta bastante condizente com a dieta de C. jacchus na Caatinga, uma alimentação bastante oportunística que se baseia no que for encontrado durante o deslocamento, principalmente seiva de árvore e insetos, tornando mais fácil conhecer onde esses alimentos estão concentrados no espaço (manchas), ao invés de tentar se adaptar apenas a recursos variáveis ao longo do tempo. Os resultados alcançados também ampliam mais o conhecimento sobre a cognição espacial em saguis, uma vez que ela já havia sido observada em cativeiro por Piza et al., 2024 e Sehner et al., 2025; em nosso estudo nós pudemos mostrar como ela também age nos animais de vida livre, C. jacchus não apenas lembra onde estão as manchas, mas usa essa informação de forma consistente para montar trajetos mais econômicos em um ambiente semiárido e com forte sazonalidade. Isso mostra que a navegação baseada em memória, antes descrita principalmente em primatas maiores, também ocorre em um dos menores primatas do grupo.

Conclusão

O deslocamento geográfico da espécie C. jacchus por entre as manchas de forrageio na Caatinga é majoritariamente orientado pela regra NN (Vizinho mais próximo) e pela memória da disposição dos recursos, não sendo por busca e traçados aleatórios. Mostrando que a NN descreve bem o funcionamento das rotas, além de se tornar mais próxima da realidade ao se adicionar o fator de sazonalidade. Com os resultados obtidos, vemos que a hipótese 1 foi confirmada, enquanto a hipótese 2 foi parcialmente confirmada. Isso revela que a memória temporal funciona apenas como um auxiliar da memória espacial nas decisões de rotas. Ao mostrar esse padrão em um primata neotropical de pequeno porte, este trabalho ajuda a entender em que condições a cognição espacial, e não o acaso, guia o movimento dos animais. Estudos futuros poderão testar se essa mesma estratégia aparece em outros grupos e em outras espécies de calitriquídeos.

Referências

Abreu, F., Garber, P. A., Souto, A., Presotto, A., & Schiel, N. (2021). Navigating in a challenging semiarid environment: The use of a route-based mental map by a small-bodied neotropical primate. Animal Cognition, 24(3), 629–643. Climate-Data.org. (2024). Clima: Açu (Brasil). Disponível em: https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-grande-do-norte/ac-u-29173/ Garcia, C., et al. (2023). Editorial: Cognition, foraging, and energetics in extant and extinct primates. Frontiers in Ecology and Evolution, 11, 1192061. Hongo, S., et al. (2018). Environmental and social factors influencing ranging in wild chimpanzees. Animal Behaviour, 140, 89–99. Hopkins, M. E. (2016). Mantled howler monkey spatial foraging decisions reflect spatial and temporal knowledge of resource distributions. Animal Cognition, 19(2), 387–403. MacArthur, R. H., & Pianka, E. R. (1966). On optimal use of a patchy environment. The American Naturalist, 100(916), 603–609. Noser, R., & Byrne, R. W. (2014). Change point analysis of travel routes reveals novel insights into foraging strategies and cognitive maps of wild baboons. American Journal of Primatology, 76(5), 399–409. Paiva, C. D. G., Moro, M. F., Sousa, L. D. O. F. D., & Baldauf, C. (2021).

Phytosociology of the caatinga in Floresta Nacional de Açu, Rio Grande do Norte, Brazil, and surroundings. Hoehnea, 48, e222020. Piza, D. B., et al. (2024). Primacy of vision shapes behavioral strategies and neural substrates of spatial navigation in marmoset hippocampus. Nature Communications, 15(1), 4053. Presotto, A., et al. (2018). Intersection as key locations for bearded capuchin monkeys traveling within a route network. Animal Cognition, 21(3), 393–405. Robira, B., Benhamou, S., Bayanga, E. O., Breuer, T., & Masi, S. (2023). How do primates decide where to feed? Insights from wild western gorillas. Animal Behaviour, 204, 25–36. Sehner, S., et al. (2025). Common marmosets (Callithrix jacchus) excel in a one-trial spatial memory test, yet perform poorly in a classical memory task. Animal Cognition, 28(1), 24. Sen Gupta, A., & Radhakrishna, S. (2016). Ranging behavior of bonnet macaques in a heterogeneous landscape. International Journal of Primatology, 37(1), 80–97. Shaffer, C. A. (2014). Spatial foraging in free ranging bearded sakis: Traveling salesmen or Lévy walkers? American Journal of Primatology, 76(5), 472–484. Trapanese, C., Meunier, H., & Masi, S. (2019). What, where and when: Spatial foraging decisions in primates. Biological Reviews, 94(2), 483–502. Xavier, D. P., Abreu, F., Souto, A., & Schiel, N. (2024). Choosing the best way: How wild common marmosets travel to efficiently exploit resources. Animal Cognition, 27(1), 6.

CÓDIGO: SB1689

AUTOR: AYLANNA PIETRA GUIMARAES DA COSTA

ORIENTADOR: VANESSA GRAZIELE STAGGEMEIER

TÍTULO: Fenologia reprodutiva da Mata Atlântica: padrões, gatilhos e lacunas

Resumo

A fenologia reprodutiva compreende o estudo dos eventos de floração e frutificação das plantas. Neste trabalho, revisamos estudos de comunidades desenvolvidos na Mata Atlântica que amostraram 10 ou mais espécies. Foram identificadas 42 pesquisas publicadas entre 1989 e 2023. Notou-se um hiato de 18 anos entre a primeira publicação sobre fenologia reprodutiva no Sudeste e a pioneira no Nordeste, ocorrida apenas em 2007. Atualmente, o Sudeste concentra a maior parte dos estudos (66,67%), seguido pelo Sul (26,67%) e pelo Nordeste (apenas 4 estudos). Quanto à duração, a maioria dos levantamentos estendeu-se por 12 meses (37,8%), enquanto apenas 8,9% ultrapassaram três anos de observações (48 a 120 meses).

Ao todo, foram registrados 2.850 táxons, correspondendo a 1.513 espécies distribuídas em 144 famílias botânicas (considerando que uma mesma espécie pode ter sido amostrada em diferentes trabalhos). Seis espécies foram estudadas em 10 ou mais comunidades: Guapira opposita (16 estudos), seguida por Tapirira guianensis e Cabralea canjerana (11 cada), Euterpe edulis, Syagrus romanzoffiana e Luehea divaricata (10 cada). As famílias com maior riqueza específica foram Fabaceae (154 espécies), Myrtaceae (100), Asteraceae (75), Solanaceae (72), Melastomataceae (70), Rubiaceae (70) e Bromeliaceae (50).

Palavras-chave: Fenologia. Fenologia reprodutiva. Comunidades. Mata Atlântica.

TITLE: Reproductive phenology of the Atlantic Forest: patterns, triggers, and gaps.

Abstract

Reproductive phenology encompasses the study of plant flowering and fruiting events. In this study, we reviewed community-level research conducted in the Atlantic Forest that included 10 or more species. We identified 42 studies published between 1989 and 2023. An 18-year gap was noted between the first publication on reproductive phenology in the Southeast and the pioneering study in the Northeast, which appeared only in 2007. Currently, the Southeast accounts for the majority of studies (66.67%), followed by the South (26.67%) and the Northeast (only 4 studies). Regarding duration, most surveys spanned 12 months (37.8%), while only 8.9% exceeded three years of observation (48 to 120 months). In total, 2,850 taxa were recorded, corresponding to 1,513 species distributed across 144 botanical families (accounting for the fact that the same species may have been sampled in different studies). Six species were sampled in 10 or more communities: Guapira opposita (16 studies), Tapirira guianensis e Cabralea canjerana (11 each), Euterpe edulis, Syagrus romanzoffiana e Luehea divaricata (10 each). The families with the highest species richness were Fabaceae (154 species), Myrtaceae (100), Asteraceae (75), Solanaceae (72), Melastomataceae (70), Rubiaceae (70), and Bromeliaceae (50). The observed temporal and spatial patterns reflect the historical effect of the initial establishment of this field of research in the Southeast region.

Keywords: Phenology. Reproductive phenology. Communities. Atlantic Forest.

Introdução

Fenologia é o estudo dos eventos biológicos repetitivos (Visser, 2022), tais como a migração das aves e os períodos de crescimento e reprodução das plantas. Estudos apontam que existe uma sincronia entre esses eventos e as mudanças sazonais das estações ao longo do ano. Por exemplo, eventos de floração podem ser afetados por condições como a temperatura e recursos como o fotoperíodo, ocorrendo no momento mais favorável para as espécies onde elas podem obter recursos e distribuir para a produção das flores (Elzinga et al., 2007). Fatores bióticos como a disponibilidade de polinizadores e a ocorrência de patógenos e predadores podem modular os padrões de oferta de flores (Schemske et al. 1977; Boulter et al. 2006).

Estudos que descrevam o período dos eventos reprodutivos das plantas são úteis para a compreensão da disponibilidade de recursos, manejo das espécies e conservação ecológica (Morellato et al. 2016). Muitos estudos de fenologia vegetal já foram realizados na Mata Atlântica (Mendoza et al. 2017) e embora existam revisões de fenologia dos neotrópicos apontando esse padrão, não há ainda uma síntese focada nos padrões de floração e frutificação neste bioma. Considerando o contexto de forte degradação antrópica que a Mata Atlântica vem sofrendo ao longo dos anos (Joly et al. 2014), é fundamental a elaboração de estudos que contribuam para o entendimento do processo de reprodução e regeneração das plantas visto que essa informação pode subsidiar ações de conservação (exemplos em Morellato et al. 2016, Box 1).

Dessa forma, este trabalho visa analisar dados fenológicos reprodutivos da Mata Atlântica obtidos a partir de uma base de dados elaborada para o capítulo de revisão fenológica do Neotrópico (Morellato et al., 2025). A distribuição espacial e temporal dos registros será descrita, bem como, os períodos de floração e frutificação nos níveis da comunidade e das espécies. Como objetivos específicos iremos:

Revisar o conhecimento científico produzido sobre a fenologia da Mata Atlântica, descrevendo padrões espaciais e temporais dos estudos;

Identificar lacunas para serem preenchidas por futuros estudos.

Metodologia

Obtenção dos dados

A análise de dados fenológicos da Mata Atlântica foi obtida a partir da base de dados elaborada para o capítulo de revisão fenológica no Neotrópico por Morellato et al. (2025), a qual foi feita a partir de um levantamento sistemático nas principais bases de dados eletrônicas: a Web of Science, a Scielo e o Google Scholar. No trabalho original o objetivo foi identificar estudos de fenologia reprodutiva de espécies nativas da América Central e do Sul, seguindo os critérios de Morellato (2003) e Morellato et al. (2013). Aqui fizemos um recorte desses dados para estudos desenvolvidos na Mata Atlântica. Fenofases vegetativas, como brotamento de folhas, folhagem e queda de folhas, não foram incluídas nessa revisão. As palavras-chave usadas foram: “phenolog*”, “flowering” e “fruiting” em várias linguagens (inglês, espanhol, português, e francês).

Para que os estudos fossem selecionados para a análise, eles deveriam apresentar 10 espécies ou mais da Mata Atlântica observadas por 12 ou mais meses, além de possuir os dados do período de floração e/ou frutificação para cada uma delas. A fim de verificar se a localidade estudada atendia ao critério de ser da Mata Atlântica, se essa informação não fosse explícita no título e na metodologia do estudo, o nome do local e as coordenadas geográficas eram conferidas no site do MapBiomas (https://brasil.mapbiomas.org/) . Caso o estudo não atendesse a esses critérios, o trabalho era excluído da análise e deveria ser colocado em outra planilha, essa que contempla o nome do autor e ano e a justificativa da exclusão.

Assim que essas informações eram alinhadas, o estudo passava por uma leitura crítica, identificando a metodologia de cada estudo e compreendendo como os autores classificavam os períodos de floração ou frutificação de cada espécie. Haviam estudos, por exemplo, que consideravam floração a expressão de botões e flores pela planta, outros apenas as flores em antese. Cada detalhe metodológico foi anotado na planilha de coleta dos dados. Além disso, também

foram identificados e interpretados a data média de cada fenofase, a qual, a depender do estudo, já apresentava no texto, ou deveria ser interpretada de acordo com o método semi quantitativo utilizado no trabalho, como o percentual de intensidade de Fournier, sendo sempre que possível atribuída ao pico da fenofase, quando não ao ponto médio do período de expressão da fenofase.

Também foram considerados para registro, as famílias taxonômicas, o número de indivíduos por espécie, a forma de vida (árvore, erva, trepadeira), além da síndrome de polinização das flores e dispersão dos frutos. Para organizar todas essas informações, os dados eram transferidos para uma planilha do Google Planilhas, no qual cada coluna representa as informações selecionadas, incluindo também os nomes dos autores, ano de publicação e link do DOI dos artigos. Nas linhas eram contemplados as espécies e períodos das observações dos estudos. A fim de auxiliar a transferência desses dados, ferramentas como Tabula, leitores de PDF, LibreOffice, e ferramentas de Inteligência Artificial foram utilizadas. Nos trabalhos em que não era possível realizar a extração de dados por essas ferramentas, os dados eram registrados manualmente.

Resultados e Discussões

Foram encontradas 42 publicações na literatura contendo informações de floração e frutificação para espécies de Mata Atlântica. Estas pesquisas foram desenvolvidas entre 1989 e 2023 (Fig. 1). Em um período de cinco anos, foi mostrado que: de 1989 a 1993, houve o total de um estudo, e a esse valor, apenas um estudo foi acrescido entre 1994 a 1998, totalizando dois estudos. Dentre os períodos 1999-2003; 2009-2013; 2014-2018; o número foi frequente, com sete apenas. O pico de publicações foi de 2004 a 2008, com dez estudos contabilizados, e 2019 a 2023, com oito publicações.

Além disso, 45 comunidades foram estudadas (Fig. 2). Há uma tendência de maior concentração dos estudos na região sudeste (66,67%), seguida pela região sul (26,67%) enquanto que o norte da Mata Atlântica (da Bahia ao Rio Grande do Norte) tem apenas três estudos (6,67%), os quais foram desenvolvidos na Bahia (1) e Paraíba (2).

A maioria das comunidades estudadas foram monitoradas ao longo de 12 meses (37,8%), estudos com duração de 24 a 36 meses foram frequentes (40,2%) e de longa duração (7 a 10 anos) foram raros, apenas 3 estudos (6,7%; Quadro 1). Para a frequência com que as amostragens dos estudos foram coletadas, foi concluído que análises mensais são frequentes (66,67%), seguida pelas quinzenais (22,2%). Já com as menores frequências observadas estão as: semanalmente (8,8¨%) e semanalmente a mensal com apenas 1 estudo. (2,2%; Quadro 2).

Figura 1- Gráfico de distribuição temporal das pesquisas desenvolvidas

Figura 2- Mapa de distribuição das comunidades estudadas

A maioria das comunidades estudadas foram monitoradas ao longo de 12 meses (37,8%), estudos com duração de 24 a 36 meses foram frequentes (40,2%) e de longa duração (7 a 10 anos) foram raros, apenas 3 estudos (6,7%; Tabela 1). Para a frequência com que as amostragens dos estudos foram coletadas, foi concluído que análises mensais são frequentes (66,67%), seguida pelas quinzenais (22,2%). Já com as menores frequências observadas estão as: semanalmente (8,8¨%) e semanalmente a mensal com apenas 1 estudo. (2,2%; Quadro 2).

Tabela 1. Duração das observações fenológicas nas 45 localidades estudadas

Quadro 2- Frequência de amostragem observadas

Ao todo foram estudadas 144 famílias botânicas com 2850 táxons, um táxon pode aparecer mais de uma vez na contagem se houver mais de um estudo avaliando a fenologia dele. Dessa forma foram amostradas 1513 espécies identificadas ao nível específico. Além destas, houve um total de 205 táxons indeterminados, sendo 50 táxons classificados no nível de família e 155 ao nível de gênero.

Onze famílias contribuíram com mais de 50% das espécies amostradas. São elas: Fabaceae (154 espécies), Myrtaceae (100), Asteraceae (75), Solanaceae (72), Melastomataceae (70), Rubiaceae (70), Bromeliaceae (50), Bignoniaceae (48), Lauraceae (44), Sapindaceae (42) e Malvaceae (41). Além delas, outras 133 famílias somaram 747 espécies (Anexo 1).

Trinta e uma espécies foram estudadas em 6 ou mais comunidades (Tabela 2), sendo Guapira opposita a mais estudada ao longo da Mata Atlântica (16 comunidades), seguida por Tapirira guianensis (11), Cabralea canjerana (11), Euterpe edulis (10), Syagrus romanzoffiana (10) e Luehea divaricata (10).

Tabela 2- Espécies mais estudadas

De modo geral, a análise dos estudos selecionados demonstram que as publicações concentram-se mais em determinados períodos e regiões do país, indicando possíveis divergências no fomento à pesquisa em diferentes épocas e lugares. Para a duração dos estudos e das frequências de amostragem, foi observado maior representatividade de estudos a curto prazo que a longo prazo, da mesma forma que as frequências das amostragens mensais são mais recorrentes que as semanais, indicando dificuldades na continuação de estudos de maior tempo de dedicação. Observou-se uma riqueza elevada de táxons distribuídos ao longo da Mata Atlântica. Desse modo, os resultados demonstram a importância de quantificar publicações acadêmicas sobre a fenologia reprodutiva da Mata Atlântica, a fim de que seja possível identificar lacunas que existem nesse âmbito de estudo.

O primeiro estudo foi publicado em 1989, e esses valores permaneceram baixos na década de 90. Isso pode ser explicado pela ausência de políticas de expansão

do acesso às universidades públicas, pois na década de 90 existiam menos de 20 universidades localizadas na região sudeste. No início do século XXI, em que houve a implementação de políticas de expansão e interiorização das universidades, a principal consequência foi o aumento significativo nas universidades federais (BIZERRIL, 2020). Assim, isso pode justificar o pico na quantidade de estudos publicados entre 2004 e 2008, pois mais pessoas tiveram acesso ao ensino superior e à produção de pesquisas acadêmicas.

Além disso, somente após os anos 2000, no Quarto Relatório de Avaliação do IPCC (AR4, 2007), que a fenologia foi reconhecida como fundamental para o monitoramento das mudanças climáticas (MORELLATO; ABERNETHY; MENDOZA, 2018). Então, esse reconhecimento pode ser um indicador pelo qual a fenologia passou a ser mais estudada durante os anos seguintes.

Em relação aos estudos possuírem maior concentração na região sudeste, é fato que o estado de São Paulo é pioneiro em pesquisas acadêmicas, visto que possui um grande investimento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agência estadual que investe fortemente em pesquisa e educação para o estado (Catanzaro et al., 2014). Além disso, a principal pesquisadora na área de fenologia na América Latina está baseada no interior do estado de São Paulo, Patrícia Morellato na UNESP.

Em contrapartida, a região nordeste carece de estudos de fenologia da Mata Atlântica, pois a região sempre foi muito devastada, desde o período colonial, quando os portugueses exploraram a grande riqueza natural existente e ilimitada no território (BORGES et al. 2009). Em 2025, segundo o Relatório Anual do Desmatamento no Brasil 2025 (RAD2025), a região nordeste teve 4.662 hectares desmatados, sendo o estado da Bahia com a maior concentração. Dessa forma, o contínuo desmatamento do bioma na região dificulta a realização de pesquisas de longa duração, as quais seriam de suma importância pois contribuem ainda mais para o entendimento da fenologia da flora desse bioma, além de facilitar o conhecimento sobre as mudanças climáticas (MORELLATO; ABERNETHY; MENDOZA, 2018)

A maior disponibilidade de estudos com duração de 12 meses, pode demonstrar uma ausência de recursos para investir em pesquisas de longa duração, visto que as localidades estudadas por 7 a 10 anos foram raras. Em outras revisões de fenologia no Neotrópico, o monitoramento a longo prazo já foi classificado como raro, visto que foram encontrados apenas dez locais de estudo com monitoramento de 10 ou mais anos com dados sobre a fenologia (MENDOZA; PERES; MORELLATO, 2017). Recursos como infraestrutura física, desenvolvimento tecnológico, ambiente institucional, entre outros, são determinantes para a produtividade dos laboratórios e para a produção científica (NEGRI; SQUEFF, 2016) Assim como a duração da observação dos estudos, a frequência de amostragem mensal ser mais frequente que a semanal, por exemplo, também pode ser um reflexo na ausência de recursos e uma forma de reduzir gastos. Isso demonstra, portanto, a importância de oferecer o devido suporte aos pesquisadores brasileiros, a fim de que eles possam continuar com as pesquisas e entregar trabalhos de qualidade para a sociedade e comunidade científica.

Sobre as famílias que contribuíram com 50% ou mais das espécies amostradas nos estudos, elas sugerem que as pesquisas acompanham a riqueza real da Mata Atlântica. No trabalho de Oliveira-Filho & Fontes (2000) que realizou um levantamento de florística na florestas atlânticas do sudeste brasileiro, os resultados mostraram que as famílias com maior número de espécies são Myrtaceae e Fabaceae, revelando uma predominância dessas famílias não somente no bioma atlântico como também na floresta tropical amazônica e cerrado. Nesse sentido, os pesquisadores encontram maior facilidade para estudar elas, pois oferecem maior material para estudo e relevância ecológica, contribuindo para entender as florestas.

Conclusão

As análises realizadas permitiram caracterizar o atual panorama dos estudos de fenologia reprodutiva realizados na Mata Atlântica, concluindo que houve um crescimento na quantidade de publicações, que pode ter relação com o aumento de investimento e expansão das universidades federais, além do reconhecimento da fenologia como um indicador das mudanças climáticas. A partir do levantamento também foi possível observar a diferença de distribuição das comunidades estudadas, revelando maior concentração em determinadas regiões do país.

Dados como a duração das observações e frequência que as amostragens foram coletadas, demonstraram uma atual dificuldade em realizar pesquisas de maior duração no âmbito fenológico, cenário que pode estar relacionado com ausência de recursos e diminuição de custos para realizar as coletas. Ademais, foi observado uma diversidade de táxons estudados, contribuindo significativamente para a compreensão da riqueza existente na Mata Atlântica e o quanto ainda pode ser estudado.

Nesse sentido, o levantamento realizado contribui para reunir e sistematizar informações que podem auxiliar na identificação de padrões e lacunas existentes na produção científica sobre o tema. Além disso, urge a necessidade de estudos de longa duração e ampliação das comunidades observadas, explorando, principalmente, a região nordeste do país, a fim de expandir o conhecimento florístico dessas áreas.

Referências

ABERNETHY, K. et al. Current issues in tropical phenology: a synthesis. Biotropica, v. 50, n. 3, p. 477-482, 2018. DOI: 10.1111/btp.12558.

BIZERRIL, M. X. A. O processo de expansão e interiorização das universidades federais brasileiras e seus desdobramentos. Revista Tempos e Espaços em Educação, v. 13, n. 32, p. 1-15, 2020. DOI: 10.20952/revtee.v13i32.13456.

BORGES, L. A. C.; REZENDE, J. L. P. de; PEREIRA, J. A. A. Evolução da legislação ambiental no Brasil. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 2, n. 3, p. 447-466, 2009. DOI: 10.17765/2176-9168.2009v2n3p447-466.

BOULTER, S. L.; KITCHING, R. L.; HOWLETT, B. G. Family, visitors and the weather: patterns of flowering in tropical rain forests of northern Australia. Journal of Ecology, v. 94, n. 2, p. 369-382, 2006.

CATANZARO, M. et al. South American science: big players. Nature, v. 510, n. 7504, p. 204-206, 2014. DOI: 10.1038/510204a.

ELZINGA, J. A. et al. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. Trends in Ecology & Evolution, v. 22, n. 8, p. 432-439, ago. 2007. DOI: 10.1016/j.tree.2007.05.006.

FREIRE, J. M. et al. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, v. 33, n. 75, p. 243-252, jul./set. 2013. DOI: 10.4336/2013.pfb.33.75.454. Disponível em:https://pfb.sede.embrapa.br/pfb/article/view/454. Acesso em: 7 out. 2025.

GASPER, A. L. de et al. Brazilian herbaria: an overview. Acta Botanica Brasilica, v. 34, n. 2, p. 352-359, abr. 2020. DOI: 10.1590/0102-33062019abb0390.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. New Phytologist, v. 204, n. 3, p. 459-473, 2014. DOI: 10.1111/nph.12989.

MAPBIOMAS. RAD2025: Relatório Anual do Desmatamento no Brasil 2025. São Paulo: MapBiomas, 2025. DOI: 10.58053/MapBiomas/YMT6I2. Disponível em:http://alerta.mapbiomas.org. Acesso em: 30 ago. 2026.

MENDOZA, I.; PERES, C. A.; MORELLATO, L. P. C. Continental-scale patterns and climatic drivers of fruiting phenology: A quantitative Neotropical review. Global and Planetary Change, v. 148, p. 227-241, 2017. DOI: 10.1016/j.gloplacha.2016.12.001.

MORELLATO, L. P. C. South America. In: SCHWARTZ, M. D. (ed.). Phenology: an integrative environmental science. 1. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 75-92. DOI: 10.1007/978-94-007-0632-3_6.

MORELLATO, L. P. C.; ABERNETHY, K.; MENDOZA, I. Rethinking tropical phenology: Insights from long-term monitoring and novel analytical methods. Biotropica, v. 50, n. 3, p. 371-373, 2018. DOI: 10.1111/btp.12563.

MORELLATO, L. P. C.; ALTOMARE, M.; GRESSLER, E. A review of reproductive plant phenology in south and Central America: new perspectives. In: SCHWARTZ, M. D. (ed.). Phenology: an integrative environmental science. New York: Springer, 2025. p. 107-138.

MORELLATO, L. P. C.; CAMARGO, M. G. G.; GRESSLER, E. A review of plant phenology in South and Central America. In: SCHWARTZ, M. D. (ed.). Phenology: an integrative environmental science. 2. ed. New York: Springer, 2013. p. 91-113. DOI: 10.1007/978-94-007-6925-0_6.

NEGRI, F. de; SQUEFF, F. de H. S. (org.). Sistemas setoriais de inovação e infraestrutura de pesquisa no Brasil. Brasília, DF: IPEA: FINEP: CNPq, 2016. 637 p.

O'DEA, R. E. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses in ecology and evolutionary biology: a PRISMA extension. Biological Reviews, Cambridge, v. 96, n. 5, p. 1695-1722, set. 2021. DOI: 10.1111/brv.12721.

SCHEMSKE, D. W. et al. Flowering ecology of some spring woodland herbs. Ecology, v. 59, n. 2, p. 351-366, 1978. DOI: 10.2307/1936372.

VISSER, M. Phenology: climate change is shifting the rhythm of nature. In: SARASAS, P. (ed.). Frontiers 2022: Noise, Blazes and Mismatches: Emerging Issues of Environmental Concern. v. 4. Nairobi: United Nations Environment Programme (UNEP), 2022. p. 41-58.

Anexos



Figura 1- Gráfico de distribuição temporal das pesquisas desenvolvidas



Figura 2- Figura 2- Mapa de distribuição das comunidades estudadas



Tabela 1. Duração das observações fenológicas nas 45 localidades estudadas



Quadro 2- Frequência de amostragem observadas



Tabela 2. Espécies mais estudadas



Tabela 2. Espécies mais estudadas



Anexo 1- Total de espécies por família estudadas em pesquisas fenológicas de floração e/ou frutificação ao longo de comunidades de Floresta Atlântica.

CÓDIGO: SB1694

AUTOR: BARBARA KALLYANA VARELA ANGELO

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Análise das Interações Quânticas entre Testosterona e Progesterona com a Enzima Hepática AKR1D1.

Resumo

A enzima Δ4-3-cetosteróide 5β-redutase humana (AKR1D1) atua como reguladora da disponibilidade biológica de esteroides e do perfil metabólico, estando associada a distúrbios como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e doença hepática gordurosa não alcoólica. Portanto, compreender o seu mecanismo de ação é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Neste estudo, investigaram-se, por meio de métodos de mecânica quântica e simulações computacionais, utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e o Método de Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC), as interações da AKR1D1 com dois hormônios esteroides: a testosterona e a progesterona. No complexo TES-AKR1D1, os resíduos que mais contribuíram para a energia de atração foram: TRP230 > TYR26 > SER225 > TYR132 > TYR58, enquanto, no complexo STR-AKR1D1, destacaram-se os resíduos TRP230 > TYR132 > TRP89 > TYR26 > TRP314. A testosterona apresentou maior energia de interação total com a enzima, em comparação com a progesterona, e o resíduo TRP230 desempenhou papel determinante no posicionamento dos ligantes em ambos os sistemas.

Palavras-chave: AKR1D1. Testosterona. Progesterona. Hormônios esteroides. DFT. MFCC.

TITLE: Analysis of Quantum Interactions between Testosterone and Progesterone with the Liver Enzyme AKR1D1.

Abstract

The human Δ4-3-ketosteroid 5β-reductase enzyme (AKR1D1) regulates steroid biological availability and metabolic profiles and is associated with disorders such as obesity, type 2 diabetes mellitus, and non-alcoholic fatty liver disease. Therefore, understanding its mechanism of action is fundamental for the development of new therapeutic approaches. In this study, we investigated the interactions of AKR1D1 with two steroid hormones, testosterone and progesterone, using quantum mechanical methods and computational simulations based on density functional theory (DFT) and the molecular fractionation method with conjugated layers (MFCC). In the TES-

AKR1D1 complex, the residues that contributed most to the attraction energy were: TRP230 > TYR26 > SER225 > TYR132 > TYR58, while in the STR-AKR1D1 complex, the residues TRP230 > TYR132 > TRP89 > TYR26 > TRP314 stood out. Testosterone exhibited a higher total interaction energy with the enzyme than progesterone, and the TRP230 residue played a decisive role in ligand positioning in both systems.

Keywords: AKR1D1. Testosterone. Progesterone. Steroid hormones. DFT. MFCC.

Introdução

Os hormônios esteroides, especialmente os androgênicos anabólicos e os glicocorticoides, são essenciais para a regulação do fenótipo metabólico. Variações nas concentrações desses hormônios, seja por excesso ou por falta, estão diretamente relacionados a doenças em homens e mulheres, como: obesidade, diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica e outras que, como consequências mais graves, podem culminar em cirrose, carcinoma hepatocelular e aumento do risco de ataques cardiovasculares (DOWMAN, 2013). A disponibilidade biológica desses hormônios é regulada pelo fígado, por meio de várias enzimas hepáticas que podem ser manipuladas geneticamente e farmacologicamente, provocando grande impacto metabólico.

A progesterona, derivada do colesterol, é o principal hormônio esteroide nas mulheres, juntamente com o estrogênio, sendo sintetizados em diferentes tecidos endócrinos (HAAS et al, 2016). Por sua vez, a testosterona, também derivada do colesterol, é o principal hormônio esteroide masculino, sendo precursora de outros esteroides anabólicos androgênicos (FERREIRA et al., 2007). A função principal dessas três moléculas é o desenvolvimento das características sexuais, primárias e secundárias, masculinas e femininas, porém, o espectro de ação desses hormônios e seus substratos metabólicos é amplo e inclui tanto funções reprodutivas quanto não reprodutivas (HAAS et al, 2016) Excluindo o estrogênio, todos os hormônios esteróides possuem uma estrutura em comum, o Δ4-3-cetosteróide (ver Figura 1), que possui 4 anéis de carbono e uma ligação dupla entre os carbonos C4 e C5 (PAULA, 2016).

A biossíntese de esteroides no fígado humano possui duas fases. A fase I envolve reações de oxidação, redução e hidrólise, sendo realizada por enzimas monooxigenases da superfamília dos citocromos P450s, oxidorredutases da família das desidrogenases redutases de cadeia curta (SDRs), enzimas da superfamília das aldo-ceto redutases (AKRs) e a 5α-redutase. Dessas, apenas duas são capazes de saturar a dupla ligação presente na estrutura dos Δ4-3-cetosteroides: as 5α redutases (SRD5A1 e SRD5A3) e a 5β redutase (AKR1D1) (DRURY, 2010).

A AKR1D1 inibe, aparentemente, a ação anabólica e androgênica dos hormônios esteroides ao inserir uma curva de 90° na junção do anel A/B, realizando a redução da ligação dupla entre os carbonos C4 e C5. Essa mudança de conformação é uma etapa fundamental na produção dos ácidos biliares e a AKR1D1 é a única enzima, nos seres humanos, capaz de catalisar essa curva (RIŽNER e PENNING, 2014).

Justificativa

Sabe-se que a enzima AKR1D1 é fundamental para o equilíbrio das concentrações e para o metabolismo dos hormônios esteroides no corpo humano. Em função da gravidade dos distúrbios metabólicos decorrentes da sua atividade ou inativação, a AKR1D1 vem sendo apontada como um alvo relevante para o desenvolvimento de fármacos destinados a esses problemas. Nesse sentido, estudos que realizem o mapeamento das energias de interação por meio de simulações computacionais, capazes de revelar tanto os mecanismos de ação produtiva quanto os de inibição, interações improdutivas da enzima, podem trazer contribuições importantes para a exposição e solução desses distúrbios.

Objetivo Geral:

Analisar as particularidades da interação entre a testosterona e a progesterona e a enzima AKR1D1, identificando os resíduos de maior importância para a formação dos dois sistemas.

Objetivos Específicos:

Quantificar as energias de interação que estabilizam cada complexo;

Calcular as energias de ligação dos complexos;

Identificar os principais resíduos de aminoácido envolvidos na interação da enzima com os ligantes;

Analisar a natureza das interações intermoleculares que regem o sistema de forma qualitativa.

Metodologia

As estruturas cristalográficas foram obtidas para a realização dos cálculos, disponíveis no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank (RCSB - PDB), um repositório de dados estruturais de macromoléculas biológicas. Cada complexo é identificado por um código no PDB, sendo eles 3BUR, para o complexo TES-NADP-AKR1D1 (testosterona), e 3COT, para o complexo STR-NADP-AKR1D1 (progesterona).

As estruturas foram obtidas por meio da técnica de difração de raio-X, tendo por resolução 1.62 Å para a 3BUR e 2.03 Å para a 3COT. A difração de raio-X consiste na interferência construtiva de raio-X monocromáticos em uma amostra cristalina, sendo possível definir a impressão digital de arranjos atômicos periódicos na amostra. Com essa impressão, obtêm-se os elementos químicos da amostra e seus espaçamentos atômicos, possibilitando a criação do cristal 3D (BUNACIU, UDRIŞTIOIU E ABOUL-ENEIN, 2015). Dentre os dois monômeros, A e B, presentes na proteína, que é um

dímero, o monômero A foi selecionado para o estudo por apresentar menos falhas estruturais decorrentes do processo de cristalografia.

Algumas informações podem ser perdidas durante a obtenção do cristal. Portanto, são necessários processos de otimização das estruturas cristalográficas quando se realizam estudos sobre elas, para que os modelos sejam energeticamente estáveis. (RYDE, 2016; ZHANG, 2017). Para a realização desse processo, utilizou-se o software Discovery Studio.

Foi realizada a fixação da proteína, seguida da adição das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e adição dos hidrogênios, que são dificilmente visualizados nos mapas de densidade durante a criação do cristal por apresentarem uma dispersão muito fraca e, por isso, não vêm na estrutura cristalográfica (CALDARARU et al., 2019). A otimização geométrica dos átomos de hidrogênio foi realizada por meio do campo de força CHARMM (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics), parametrizado para moléculas orgânicas (MOMANY, 1992), o que possibilitou maior acurácia nos cálculos energéticos (LIMA NETO et al., 2018).

Para avaliar o estado de protonação dos ligantes em ambos os sistemas, utilizou-se o software Marvin Sketch, (https://chemaxon.com/products/marvin), permitindo um ajuste mais adequado da atividade enzimática. Na análise dos resíduos de aminoácidos da proteína, aplicou-se a ferramenta PROPKA, (SØNDERGAARD, 2011). O valor de pH utilizado nos estudos foi 7,5, por representar o ambiente fisiológico hepático e estar de acordo com as condições conformacionais observadas na cristalografia.

Para determinar as energias de interação entre ligante e proteína, é necessário incluir todos os aminoácidos que estabelecem interações relevantes com o ligante (BEZERRA et al., 2019). Para isso, delimitou-se um perímetro ao redor do ligante, inicialmente com raio de 2 Å. Esse valor foi aumentado progressivamente a cada 0,5 Å, até que a diferença de energia observada fosse inferior a 10% em relação ao raio anterior (LIMA NETO et al., 2018). A convergência foi atingida com o raio de 4,5 Å, contudo, foram avaliados ainda alguns raios adicionais para confirmar a estabilidade da convergência.

O Método de Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC), aplicado no estudo quântico de proteínas e macromoléculas, pressupõe que resíduos de aminoácidos localizados em regiões distantes podem exercer pouca ou nenhuma influência direta sobre a área de interesse. Assim, a análise da estrutura completa pode ser desnecessária, além de demandar maior tempo e custo computacional. Nesse contexto, a divisão da proteína em subsistemas, seguida da combinação dos resultados individuais, torna o MFCC uma abordagem eficiente para sistemas complexos (HE et al., 2014).

Por meio de simulações computacionais, a proteína é fragmentada em seus resíduos de aminoácidos determinados. Como a quebra da cadeia polipeptídica deixa as extremidades dos resíduos com valências livres, são adicionados os aminoácidos precedentes e subsequentes, denominados caps, para fechar essas valências (GORDON et al., 2012).

Após a fragmentação via MFCC, calculam-se as energias de interação com base na Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Os valores obtidos são aplicados na seguinte equação: $E(L - Ri) = E(L + C1\text{-}i\ Ri\ Ci{+}1) - E(L + C1\text{-}i\ Ci{+}1) - E(C1\text{-}i\ Ri\ Ci{+}1) + E$

(C1-i Ci+1) onde E (L – Ri) representa a energia de interação entre o ligante (L) e o resíduo de aminoácido (Ri). Os termos C1-i e Ci+1 correspondem, respectivamente, aos aminoácidos anteriores e posteriores (caps) utilizados para fechar a valência do fragmento. O cálculo considera quatro subsistemas distintos, e a combinação dos resultados permite isolar a energia de interação entre o ligante e o aminoácido alvo (GORDON et al., 2012). Os cálculos de energia dos subsistemas foram realizados no software Gaussian (FRISCH et al., 2009), com base no DFT. Para a descrição funcional, adotou-se o B97D (GRIMME, 2006), fundamentado na aproximação do gradiente generalizado (GGA).

Considerando que, em estudos de macromoléculas biológicas, o meio em que a proteína se encontra exerce influência direta sobre as interações moleculares, recorreu-se a um meio dielétrico contínuo (ε) para simular o ambiente fisiológico. Aplicou-se o modelo de solvatação CPCM (Continuous Polarizable Continuum Model) (Cossi et al., 2003), associado a duas constantes dielétricas distintas. A constante ε=40 foi empregada para melhor estabilização das energias de interação, por representar de forma mais próxima o ambiente fisiológico, e a constante ε=10, por se aproximar mais do vácuo, foi usada para permitir a comparação dos resultados e reduzir o risco de inconsistências no cálculo das energias de interação (DANTAS et al., 2015; OURIQUE et al., 2016).

Resultados e Discussões

Como descrito na metodologia, paraa obtenção dos resultados, foram utilizadas as constantes dielétricas de 40 (ε=40) e de 10 (ε=10) para comparação do padrão energético das interações. A maior distância conhecida de interação entre dois átomos ocorre num raio de 6,5 Å (BAHAR; JERNIGAN., 1997), porém, nessa pesquisa, foi optado a realização dos cálculos até o raio de 10 Å para observar possíveis erros nos resultados.

Na ε=40, o complexo TES-AKR1D1 convergiu no raio de 5,0 Å com uma energia de -45,7 kcal/mol e obteve uma energia total até o raio de 10 Å de -50 kcal/mol (Figura 2), e na ε=10, o sistema também convergiu no raio de 5,0 Å com uma energia de -47,7 kcal/mol e energia total no raio de 10 Å de -51,7 kcal/mol (Figura 2). No complexo STR-AKR1D1, na ε=40, o sistema convergiu no raio 4,5 Å com uma energia de -40,4 kcal/mol e obteve uma energia total até o raio 10 Å de -44 Kcal/mol (Figura 3) e na ε=10 o sistema também convergiu no raio 4,5 Å com uma energia de -41,3 Kcal/mol e energia total no raio de 10 Å de -44,4 Kcal/mol (Figura 3).

Pode-se observar que a diferença entre o ponto de convergência e a energia total no raio 10 Å apresenta uma variação muito baixa, com menos de 10% de diferença entre elas. Isso significa que, a partir do raio de convergência, os aminoácidos presentes nos raios subsequentes apresentaram interação muito baixa e possivelmente não têm relevância direta para a interação do ligante com a proteína receptora. Nas Figuras 2 e 3, é possível perceber uma maior energia de atração nos primeiros raios entre o ligante e o receptor, que é justificada pela proximidade dos resíduos com o ligante.

A partir deste ponto, serão considerados apenas os resultados obtidos com a constante dielétrica ε=40, uma vez que já foi demonstrado ser a que melhor representa o ambiente fisiológico, que é solvatado (VICATOS et al., 2009; OURIQUE et al., 2016).

No monômero "A" da AKR1D1, dentro de um raio de 10 Å ao redor do ligante, foram identificados 75 aminoácidos interagindo com a testosterona. Dentre esses fragmentos, selecionaram-se os dez resíduos com maior contribuição para a energia de atração (ver Figura 4), os quais serão apresentados a seguir em ordem decrescente de energia: TRP230 (-8,1 Kcal/mol) > TYR26 (-5,7 Kcal/mol) > SER225 (-5,2 Kcal/mol) > TYR132 (-3,2 Kcal/mol) > TYR58 (-2,9 Kcal/mol) > VAL309 (-2,6 Kcal/mol) > THR224 (-2,6 Kcal/mol) > LEU311 (-2,4 Kcal/mol) > TRP314 (-2,1 Kcal/mol) > GLU120 (-2,1 Kcal/mol).

No complexo STR–AKR1D1, considerando o monômero "A" da AKR1D1 e um raio de 10 Å em torno do ligante, foram identificados 76 resíduos de aminoácidos interagindo com a progesterona. Dentre esses fragmentos, selecionaram-se os dez resíduos que apresentaram maior contribuição para a energia de atração (ver Figura 5), os quais são apresentados a seguir em ordem decrescente de energia: TRP230 (-6,7 Kcal/mol) > TYR132 (-5,9 Kcal/mol) > TRP89 (-3,2 Kcal/mol) > TYR26 (-3,1 Kcal/mol) > TRP314 (-3 Kcal/mol) > LEU311 (-2,9 Kcal/mol) > GLU120 (-2,6 Kcal/mol) > TYR58 (-2,6 Kcal/mol) > LYS87 (-1,4 Kcal/mol) > ILE57 (-1,3 Kcal/mol).

Conclusão

No organismo humano, as enzimas AKR1D1 atuam sobre diversos substratos esteroides, desempenhando um papel central na síntese de ácidos biliares, na ativação de receptores órfãos e na regulação da disponibilidade de glicocorticoides. Alterações na atividade ou inativação desta enzima podem resultar em consequências graves, como cirrose, carcinoma hepatocelular e aumento do risco de eventos cardiovasculares, entre outros (DOWMAN, 2013).

Considerando a importância clínica do metabolismo de hormônios esteroides mediado pela AKR1D1, este estudo investigou as interações da enzima com os principais hormônios esteroides, testosterona e progesterona, identificando os resíduos de aminoácidos de maior relevância energética para a formação desses complexos. Para isso, foram aplicadas técnicas de análise quântica, com simulações computacionais baseadas no Método de Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC) e na Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Essas abordagens permitiram avaliar as interações estabelecidas pelos aminoácidos da enzima com os ligantes, descrevendo suas intensidades e fornecendo informações essenciais para compreender o mecanismo de funcionamento da AKR1D1.

Dentro de um raio de 10 Å ao redor dos ligantes, foram identificados 75 resíduos de aminoácidos interagindo com a testosterona e 76 resíduos interagindo com a progesterona. Os cinco aminoácidos que mais contribuíram para a energia de atração do complexo TES-AKR1D1 foram: TRP230 > TYR26 > SER225 > TYR132 > TYR58, enquanto no complexo STR-AKR1D1, os mais relevantes foram: TRP230 > TYR132 >

TRP89 > TYR26 > TRP314. Em ambos os sistemas, o triptofano (TRP230) foi o resíduo com maior energia, o que possivelmente está relacionado à sua função de posicionar o ligante na enzima.

Aenergiadeatraçãototalobservadanocomplexo TES-AKR1D1 foi maior do que a observada no complexo STR-AKR1D1. Esse dado é significativo, pois a testosterona ocupa o sítio alostérico em uma posição paralela ao cofator, bloqueando o acesso de outros esteroides ao canal e, consequentemente, promovendo a inativação da enzima (PENNING et al., 2018).

Referências

BAHAR, Ivet; JERNIGAN, Robert L. Inter-residue potentials in globular proteins and the dominance of highly specific hydrophilic interactions at close separation.Journal of Molecular Biology, v. 266, n. 1, p. 195–214, 14 fev. 1997. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0758.

BEZERRA, Katyanna S.; FULCO, Umberto L.; ESMAILE, Stephany C.; LIMA NETO, José X.; MACHADO, Leonardo D.; FREIRE, Valder N.; ALBUQUERQUE, Eudenilson L.; OLIVEIRA, Jonas I. N.. Ribosomal RNA–Aminoglycoside Hygromycin B Interaction Energy Calculation within a Density Functional Theory Framework. The Journal Of Physical Chemistry B, [S.L.], v. 123, n. 30, p. 6421-6429, 8 jul. 2019. American Chemical Society (ACS).

BUNACIU, A. A.; UDRIŞTIOIU, E. G.; ABOUL-ENEIN, H. Y. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 45, n. 4, p. 289–299, 2015. DOI: 10.1080/10408347.2014.949616.

CALDARARU, Octav; MANZONI, Francesco; OKSANEN, Esko; LOGAN, Derek T.; RYDE, Ulf. Refinement of protein structures using a combination of quantum-mechanical calculations with neutron and X-ray crystallographic data. Acta Crystallographica Section D Structural Biology, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 368-380, 28 mar. 2019. International Union of Crystallography (IUCr).

Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G. and Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. J. Comput. Chem. 24, 669-681, 2003.

DANTAS, Diego S.; OLIVEIRA, Jonas I. N.; LIMA NETO, José X.; COSTA, Roner F. da; BEZERRA, Eveline M.; FREIRE, Valder N.; CAETANO, Ewerton W. S.; FULCO, Umberto L.; ALBUQUERQUE, Eudenilson L. Quantum molecular modelling of ibuprofen bound to human serum albumin. Rsc Advances, [S.L.], v. 5, n. 61, p. 49439-49450, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC).

DOWMAN, Joanna K.; HOPKINS, Laurence J.; REYNOLDS, Gary M.; ARMSTRONG, Matthew J.; NASIRI, Maryam; NIKOLAOU, Nikolaos; VAN

HOUTEN, E. Leonie A. F.; VISSER, Jenny A.; MORGAN, Stuart A.; LAVERY, Gareth G.. Loss of 5α-Reductase Type 1 Accelerates the Development of Hepatic Steatosis but Protects Against Hepatocellular Carcinoma in Male Mice. Endocrinology, [S.L.], v. 154, n. 12, p. 4536-4547, 1 dez. 2013. The Endocrine Society.

FERREIRA, Urival Magno Gomes et al. Esteróides anabólicos androgênicos. Revista Brasileira em Promoção da Saúde, Fortaleza, v. 20, n. 4, p. 267-275, out. 2007.

FRISCH, M. J. et al, Gaussian 09, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009.

GORDON, Mark S. et al. Fragmentation methods: A route to accurate calculations on large systems. Chemical reviews, v. 112, n. 1, p. 632-672, 2012.

GRIMME, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. J. Comput. Chem. 27, 1787-1799, 2006.

HAAS, Patrícia et al. Female hormone pattern: menopause and replacement therapy. Brazilian Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiology. Porto Alegre, p. 198-210. out. 2016. ER.

HE, Xiao; ZHU, Tong; WANG, Xianwei; LIU, Jinfeng; ZHANG, John Z. H.. Fragment Quantum Mechanical Calculation of Proteins and Its Applications. Accounts Of Chemical Research, [S.L.], v. 47, n. 9, p. 2748-2757, 22 maio 2014. American Chemical Society (ACS). HINSEN, Konrad. The molecular modeling toolkit: a new approach to molecular simulations. Journal Of Computational Chemistry, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 79-85, 30 jan. 2000. Wiley.

LIMA NETO, José X.; SOARES-RACHETTI, Vanessa P.; ALBUQUERQUE, Eudenilson L.; MANZONI, Vinicius; FULCO, Umberto L. Outlining migrainous through dihydroergotamine– serotonin receptor interactions using quantum biochemistry. New Journal of Chemistry, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 2401-2412, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC).

OURIQUE, G. S.; VIANNA, J. F.; LIMA NETO, J. X.; OLIVEIRA, J. I. N.; MAURIZ, P. W.; VASCONCELOS, M. S.; CAETANO, E. W. S.; FREIRE, V. N.; ALBUQUERQUE, E. L.; FULCO, U. L.. A quantum chemistry investigation of a potential inhibitory drug against the dengue virus. Rsc Advances, [S.L.], v. 6, n. 61, p. 56562-56570, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).

PAULA, Samuel Filipe Cardoso de. Estudo da ocorrência de reações de bio-oxidação dos esteroides progesterona e 17α-etinilestradiol por fungos de ambiente marinho. 2016. 278 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

PENNING, Trevor M; WANGTRAKULDEE, Phumvadee; AUCHUS, Richard J. Structural and Functional Biology of Aldo-Keto Reductase Steroid-Transforming Enzymes. Endocrine Reviews, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 447-475, 20 ago. 2018. The Endocrine Society.

RIžNER, Tea Lanišnik; PENNING, Trevor M.. Role of aldo–keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. Steroids, [S.L.], v. 79, p. 49-63, jan. 2014. Elsevier BV.

RYDE, Ulf; SÖDERHJELM, Pär. Ligand-Binding Affinity Estimates Supported by QuantumMechanical Methods. Chemical Reviews, [S.L.], v. 116, n. 9, p. 5520-5566, 14 abr. 2016. American Chemical Society (ACS).

SØNDERGAARD, Chresten R.; OLSSON, Mats H. M.; ROSTKOWSKI, Michał; JENSEN, Jan H.. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. Journal Of Chemical Theory And Computation, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 2284-2295, 9 jun. 2011. American Chemical Society (ACS).

VICATOS, Spyridon; ROCA, Maite; WARSHEL, Arieh. Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 670-684, 18 maio 2009. Wiley.

ZHANG, Dawei. Quantum mechanical calculation of nanomaterial-ligand interaction energies by molecular fractionation with conjugated caps method. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1- 16, mar. 2017.

Anexos



Figura 1 - Representação do Δ4-3-cetosteróide.



Figura 2 - Total da energia de interação em função do raio considerando duas constantes dielétricas, ε=10 e ε=40, para o complexo TES-AKR1D1.



Figura 3 - Total da energia de interação em função do raio considerando duas constantes dielétricas, ε=10 e ε=40, para o complexo STR-AKR1D1.



Figura 4 - BIRD dos principais aminoácidos na interação TES-AKR1D1



Figura 5 - Painel gráfico dos valores energéticos alcançados pelos principais resíduos envolvidos nas interações STR-AKR1D1.

CÓDIGO: SB1697

AUTOR: JULIA DE MACEDO DANTAS

ORIENTADOR: LUCYMARA FASSARELLA AGNEZ LIMA

TÍTULO: Caracterização e avaliação das propriedades funcionais de biossurfactante produzido por nova subespécie Acinetobacter baumannii oleum ficedula

Resumo

O setor petrolífero tem direcionado esforços para encontrar alternativas sustentáveis destinadas a mitigar os impactos ambientais provocados pela liberação de compostos tóxicos do petróleo. Muitas tecnologias são atualmente empregadas para a recuperação de ambientes contaminados, e a biorremediação do petróleo se destaca como a principal estratégia para a degradação desses poluentes de forma eficiente e de baixo custo. Nesse contexto, os biossurfactantes produzidos por diversos gêneros bacterianos surgem como moléculas promissoras devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade, e são desenvolvidos e explorados para a utilização em biorremediação. O presente trabalho objetiva produzir, caracterizar e avaliar a estabilidade e o potencial biorremediador do biossurfactante sintetizado pelo isolado bacteriano Acinetobacter baumannii oleum ficedula (BD54), oriundo de reservatório de petróleo brasileiro. A partir dessa análise química e funcional, espera-se consolidar o biossurfactante produzido como uma alternativa tecnológica viável e ecoeficiente para a indústria de petróleo e para processos de remediação ambiental.

Palavras-chave: Biorremediação, biossurfactantes, hidrocarbonetos, biotecnologia.

TITLE: Characterization and Functional Evaluation of a Surfactant Produced by a Novel Subspecies Acinetobacter baumannii oleum ficedula

Abstract

The oil sector has directed efforts toward finding sustainable alternatives to mitigate the environmental impacts caused by the release of toxic petroleum compounds. Many technologies are currently employed for the recovery of contaminated environments,

and petroleum bioremediation stands out as the primary strategy for the efficient and low-cost degradation of these pollutants. In this context, biosurfactants produced by various bacterial genera emerge as promising molecules due to their biodegradability and low toxicity, and are developed and explored for use in bioremediation. This study aims to produce, characterize, and evaluate the stability and bioremediating potential of the biosurfactant synthesized by the bacterial isolate Acinetobacter baumannii oleum ficedula (BD54), originating from a Brazilian oil reservoir. Based on this chemical and functional analysis, it is expected to consolidate the produced biosurfactant as a viable and eco-efficient technological alternative for the petroleum industry and environmental remediation processes

Keywords: Biorremediation, biosurfactants, hydrocarbons, biotechnology.

Introdução

A crescente demanda global por petróleo e seus derivados tem intensificado a ocorrência de vazamentos e derramamentos acidentais, que resultam na liberação de componentes tóxicos cujos impactos representam uma grave ameaça ao meio ambiente (Pandolfo et al., 2023). Dentre esses poluentes, destacam-se os hidrocarbonetos de petróleo, que incluem alcanos, cicloalcanos, hidrocarbonetos aromáticos, além de uma variedade de outros poluentes orgânicos, cujas características de persistência, elevada recalcitrância e difícil degradação natural impactam diretamente os componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas. (Ambaye et al., 2022) Diante desse cenário, é urgente o desenvolvimento e a aplicação de estratégias eficazes, menos custosas e seguras para mitigar os impactos provocados pela poluição dos hidrocarbonetos de petróleo, sob a ótica de promover a qualidade da saúde humana em conjunto à dos animais e à do meio ambiente.

Dentre as estratégias emergentes, a biorremediação microbiana destaca-se como uma abordagem sustentável, não invasiva e de baixo custo, utilizando a capacidade metabólica de microrganismos especializados para transformar os hidrocarbonetos em subprodutos menos tóxicos (Kebede et al., 2021). A biodegradação desses poluentes ocorre, principalmente, pela adesão microbiana ao substrato e pela produção de substâncias como os biossurfactantes, moléculas anfipáticas com papel tensoativo e emulsificante que permitem a biodisponibilização dos contaminantes para o metabolismo celular (Pandolfo et al, 2023). Os biossurfactantes são sintetizados por diversas espécies bacterianas e fúngicas, são biodegradáveis e não tóxicos, além de serem derivados de microrganismos que apresentam atividade mais apropriada para transformar esses poluentes em formas menos tóxicas ou mineralizar os contaminantes de hidrocarbonetos em CO_2, água e biomassa microbiana. (Kebede et al., 2021). A produção de biossurfactantes é amplamente relatada em diversos gêneros bacterianos, como Bacillus, Pseudomonas, Acinetobacter e Rhodococcus (Pandolfo et al., 2023). As aplicações dessas biomoléculas abrangem desde a biorremediação e a gestão de resíduos oleosos até os setores farmacêutico e alimentício, nos quais atuam como agentes umectantes, lubrificantes, estabilizantes de emulsões e antimicrobianos (Kumar, 2021). De modo geral, os biossurfactantes são classificados em duas grandes categorias com base na sua massa molecular: os de baixo peso

molecular, eficazes na redução da tensão superficial e interfacial, e os de alto peso molecular, frequentemente denominados bioemulsificantes, conhecidos por sua elevada capacidade de realizar e estabilizar emulsões (D'Almeida, 2022). Estudos como os de D'Almeida et al. e Ohadi et al. exploraram o potencial de cepas do gênero Acinetobacter na produção de diferentes tipos de biossurfactantes, incluindo heteropolissacarídeos de alta massa molecular, como o Emulsan, e biossurfactantes do tipo lipopeptídeo. Nesse contexto, estudos recentes desenvolvidos pelo Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da UFRN caracterizaram novas linhagens bacterianas obtidas de amostras ambientais com capacidade de degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes. A nova subespécie Acinetobacter baumannii oleum ficedula BD54 utiliza vias metabólicas não tradicionais na produção de biossurfactante mesmo na ausência de genes clássicos para sua síntese. A falta de identificação de um biossurfactante estruturalmente convencional sugere que essa linhagem possui mecanismos bioquímicos singulares para a remediação de poluentes (Freitas et al., 2023). Desse modo, a caracterização deste bioproduto poderá ser um avanço que pode contribuir para o futuro das estratégias de biorremediação através dos biossurfactantes microbianos, otimizando a desintoxicação de ambientes contaminados e reduzindo os impactos associados ao uso de agentes químicos sintéticos.

Metodologia

Isolado

O Acinetobacter baumannii oleum ficedula (BD54) utilizado neste estudo é proveniente do acervo do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG/UFRN). O isolado derivado de reservatório de petróleo brasileiro foi previamente caracterizado e teve seu potencial para a biossíntese de biossurfactantes confirmado em estudos anteriores.

Otimização do meio

Para a realização dos experimentos de otimização, uma colônia do isolado foi inoculada em caldo Luria-Bertani (LB) e mantida sob agitação de 180 rpm a 37°C por 16-18h. Para avaliação do IE24% em diferentes condições, o inóculo com a DO corrigida para 0,05 foi incubado em oito grupos experimentais: meio mineral IRAP e sete diferentes configurações montadas com base na exclusão individual de nutrientes essenciais (sacarose, ureia, extrato de levedura, fosfato e micronutrientes/metais). Em seguida, os frascos foram incubados em shaker seguindo condições ideais por até 48h. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante livre de células foi utilizado para a realização dos testes de emulsificação de querosene e dispersão de petróleo leve nas diferentes condições de crescimento microbiano.

Produção, extração e purificação

A produção do biossurfactante seguiu os procedimentos detalhados acima, com a inoculação da bactéria em tubos de centrifugação de 500 mL contendo meio IRAP

otimizado por experimentos anteriores. Com o volume adequado de sobrenadante contendo o biossurfactante obtido após centrifugação, a sua recuperação foi realizada utilizando o método de precipitação ácida, adaptado de Liu et al., 2015. Uma vez extraído, o biossurfactante foi submetido a um protocolo de semi-purificação por extração orgânica com acetato de etila, modificado por Irorere et al., 2018, para aumentar o seu grau de pureza e facilitar a caracterização molecular.

Caracterização química

Para a determinação da estrutura química dos bioprodutos gerados, foram utilizadas técnicas analíticas em parceria com o Instituto de Química da UFRN (IQ/UFRN). A composição molecular e quantificação de frações serão avaliadas pela técnica de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, e o detalhamento estrutural e confirmação da identidade química serão realizados por Ressonância Magnética Nuclear de Próton (1H RMN). As propriedades tensoativas serão avaliadas por meio do cálculo do Equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) do bioemulsificante, útil para classificar sua aplicabilidade industrial.

Avaliação da estabilidade do biossurfactante

A estabilidade do biossurfactante será avaliada quanto ao índice de emulsificação (IE24%) em relação ao pH, temperatura e concentração de NaCl, conforme metodologia adaptada de Rocha et al. (2014), visando identificar a estabilidade da molécula em meios ácidos, alcalinos e salinos. Para isso, o bioproduto será solubilizado em água com pH ajustado em uma faixa de 2 a 10; será submetido à adição de NaCl em concentrações variando de 0 a 50g / L-1e a altas temperaturas (60 a 120 ºC, por até 120 minutos).

Potencial biorremediador

Por fim, a eficiência voltada à biorremediação e à Recuperação Avançada de Petróleo Mediada por Microrganismos (MEOR) será mensurada por meio de ensaios de limpeza de areia contaminada e deslocamento em coluna de areia. Ademais, serão determinadas a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante semi-purificado e a diluição micelar crítica (DMC) do sobrenadante livre de células, utilizando a metodologia adaptada de Sheppard & Mulligan (1987).

Resultados e Discussões

Foram realizados experimentos de otimização do meio mineral IRAP para avaliar a produção de emulsão do isolado BD54. A partir da composição tradicional do meio, diferentes configurações foram montadas baseadas na exclusão individual de nutrientes essenciais (sacarose, ureia, extrato de levedura, fosfato e micronutrientes/metais). Desse modo, foram testados oito tipos de meio IRAP modificados, a fim de encontrar os nutrientes essenciais associados à produção de emulsão e identificar aqueles que podem ser reduzidos e/ou eliminados do meio sem prejuízos a essa capacidade.

Produção, extração e purificação

A centrifugação da cultura resultou em um sobrenadante livre de células límpido e levemente amarelado, o qual foi transferido para um recipiente estéril para posterior extração. O conteúdo bruto de biossurfactante após acidificação e centrifugação foi armazenado em tubo na geladeira, com tampa fechada e envolta no parafilme. A purificação resultou numa biomassa que foi seca e enviada ao Instituto de Química para as análises estruturais.

Caracterização química

O perfil químico do extrato semi-purificado foi realizado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). O perfil de Íons de Base revelou uma mistura complexa e heterogênea de metabólitos, conforme é possível constatar na Figura 2. Espera-se que os picos de maior intensidade correspondam às moléculas constitutivas do biossurfactante. Análises futuras são necessárias para a correta identificação dos picos cromatográficos, comparando os seus respectivos espectros de massa com bancos de dados especializados.

Mineração genômica

Em trabalhos anteriores realizados por pesquisadores do LBGM, as análises de bioinformática da cepa BD54 utilizando a ferramenta antiSMASH demonstraram baixa similaridade nos clusters conhecidos para a síntese clássica de biossurfactantes. Portanto, esse achado sugere que essa linhagem pode abrigar vias metabólicas singulares para a produção de agentes bioemulsificantes.

A esse respeito, conforme reportado pelo trabalho de Chafale, Das e Kapley (2023) a cepa Acinetobacter baumannii AKBS16 contém o cluster de genes que codificam o Emulsan, um polissacarídeo complexo com atividade bioemulsificante conhecida na literatura (Figura 3). Esse cluster é composto por dois módulos funcionais: o módulo A, que reúne genes necessários para o transporte e exportação da molécula biossintetizada, e o módulo B, constituído por genes responsáveis pela síntese de aminoaçúcares derivados de carboidratos, os quais atuam como precursores das unidades de repetição do esqueleto lipopolissacarídico. (Chafale, Das e Kapley, 2023)

Ao compará-los com o genoma de Acinetobacter baumannii oleumficedula BD54 através da plataforma BLASTp (NCBI), revelou-se a presença de oito dos vinte e dois genes relatados no cluster clássico para a produção de Emulsan (Figura 4). Baseando-se nisso, a Tabela 1 expõe os genes encontrados no cluster para produção de bioemulsificante da BD54. Todos os genes apresentam elevado grau de conservação, com identidade de sequência de aminoácidos entre 92% e 99% e E-value = 0,0. Dentre os achados, destaca-se a integridade funcional do módulo A, em virtude da conservação dos três genes de exportação do polissacarídeo, Wza, Wzb e Wzc.

Ademais, com a análise do módulo B verifica-se a presença dos genes associados à biossíntese de precursores ativados de carboidratos: galU, ugd, gpi, galE e pgm. Em conjunto, foram localizados os genes lldP e lldR, envolvidos na regulação e transporte/metabolismo do lactato, e a glicosiltransferase AmsE, pertencente a família

GT2 e muito associada ao início do fornecimento de resíduos de açúcar no exopolissacarídeo.

Em contrapartida, a ausência de genes de polimerização e transacetilação do módulo B convencional descrito por Chafale, Das e Kapley (2023), como fdtA/B, wzx e wzy, condiz com a reduzida similaridade global detectada pela ferramenta antiSMASH. Esse perfil indica que, apesar de a linhagem BD54 apresentar o mesmo mecanismo de exportação e blocos precursores conservados, ela possivelmente utiliza unidades de repetição glicídicas distintas e outro mecanismo de transporte do citoplasma ao periplasma.

A permanência da produção de emulsão mesmo na ausência de nutrientes como a ureia e sacarose demonstra que o isolado consegue manter níveis satisfatórios de emulsificação mesmo sob estresse nutricional dessas fontes. Contudo, a ausência de emulsão com a retirada seletiva do extrato de levedura (como fonte de nitrogênio orgânico) e do fosfato (essencial para o tamponamento do meio e metabolismo energético) evidencia a exigência nutricional desses compostos para a biossíntese do bioemulsificante, classificando-os como componentes limitantes e indispensáveis para o potencial biotecnológico do isolado. Esses resultados contribuem para a otimização do meio mineral utilizado para a produção do biossurfactante a ser caracterizado, permitindo o refinamento das técnicas para a sua obtenção.

Na análise genômica, o cluster encontrado para a produção de bioemulsificante é incompleto, como já documentado por Freitas et al. (2023). A análise desses resultados indica que a cepa BD54 possui parte da maquinaria genética essencial para a montagem e secreção de um biopolímero do tipo emulsan/exopolissacarídeo, mas carece de genes clássicos de transporte do citoplasma para o periplasma (wzx e wzy). Esse achado sugere que a síntese do biossurfactante opera de maneira a utilizar vias não clássicas de transporte celular, seja pelo recrutamento de flipases/polimerases ortólogas localizadas fora do locus primário, seja por vias alternativas de montagem de exopolissacarídeos.

Contudo, a presença dos produtos gênicos identificados com alta identidade demonstra a conservação da via central de fornecimento de nucleotídeos-açúcares, através dos genes gpi, pgm, galU, galE e ugd. No citoplasma, esses genes codificam as enzimas responsáveis pela conversão de metabólitos do carbono primário em precursores ativados (como UDP-glicose, UDP-galactose e UDP-ácido glicurônico). (Chafale, Das e Kapley, 2023). A identificação do gene AmsE, pertencente à família das glicosiltransferases (GT2), sugere a sua atuação na transferência do primeiro resíduo de açúcar ativado para um carreador lipídico ancorado na membrana citoplasmática, iniciando a montagem da unidade de repetição da molécula bioemulsificante.

Adicionalmente, a conservação do complexo de exportação do módulo A (Wza, Wzb e Wzc) assegura a polimerização periplasmática e a secreção transmembrana eficiente do biopolímero para o meio extracelular, garantindo a presença da atividade

bioemulsificante observada nos experimentos anteriores. Esses dados permitem compreender o processo de síntese e exportação do bioemulsificante, além de confrontar o genoma previamente analisado em busca de genes relacionados à produção de biossurfactantes descritos em cepas de Acinetobacter.

Conclusão

Os resultados obtidos confirmam o potencial biotecnológico do isolado Acinetobacter baumannii oleum ficedula (BD54) para a produção de bioemulsificantes aplicáveis à biorremediação ambiental. A otimização nutricional indicou que o extrato de levedura e o fosfato são indispensáveis para a atividade emulsificante, enquanto a ausência de sacarose e ureia não comprometeu o processo, sinalizando a viabilidade de meios de cultivo mais econômicos. No âmbito genômico, a manutenção do complexo de exportação transmembrana (Wza, Wzb, Wzc) e dos genes precursores de nucleotídeos-açúcares, aliada à ausência dos genes clássicos wzx e wzy, evidencia a atuação de vias biossintéticas alternativas. Essa singularidade metabólica é condizente com a heterogeneidade de compostos observada na análise por LC-MS. A elucidação estrutural pelas análises químicas seguintes, os ensaios de estabilidade e os testes funcionais de remoção de hidrocarbonetos consolidarão a caracterização do biossurfactante. Dessa forma, o trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre a bioquímica microbiana de reservatórios e para o desenvolvimento de soluções ecoeficientes em áreas contaminadas por petróleo.

Referências

[1] PANDOLFO, E.; BARRA CARACCIOLO, A.; ROLANDO, L. Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons. Water, v. 15, n. 2, p. 375, 16 jan. 2023.

[2] AMBAYE, T. G. et al. Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons and its reuse for agriculture: Recent progress, challenges, and perspectives. Chemosphere, v. 293, p. 133572, 1 abr. 2022.

[3] KEBEDE, G. et al. Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. Journal of Chemistry, v. 2021, n. 1, p. 1–17, 15 nov. 2021.

[4] FREITAS, J. F. et al. Genomic and phenotypic features of Acinetobacter baumannii isolated from oil reservoirs reveal a novel subspecies specialized in degrading hazardous hydrocarbons. Microbiological research, v. 273, p. 127420–127420, 1 ago. 2023.

[5] FREITAS, J. F. et al. Genomic and phenotypic characterization of novel Ochrobactrum species isolated from Brazilian oil reservoirs: Genomic diversity and bioremediation potential. Process Biochemistry, v. 149, p. 74–84, 30 nov. 2024.

[6] D'ALMEIDA, A. P. et al. Bioemulsifier production by Acinetobacter venetianus AMO1502: Potential for bioremediation and environmentally friendly applications. Marine Pollution Bulletin, v. 203, p. 116436–116436, 18 maio 2024.

[7] ZARGAR, A. N. et al. Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by Gordonia sp. IITR100. PLOS ONE, v. 17, n. 4, p. e0264202, 14 abr. 2022.

[8] OHADI, M. et al. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by Acinetobacter junii B6. International Journal of Biological Macromolecules, v. 112, p. 712–719, 1 jun. 2018.

[9] LIU, Qiang et al. Production of surfactin isoforms by Bacillus subtilis BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. Biochemical Engineering Journal, v. 93, p. 31–37, jan. 2015.

[10] IRORERE, Victor U. et al. Fatty acid synthesis pathway provides lipid precursors for rhamnolipid biosynthesis in Burkholderia thailandensis E264. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 102, n. 14, p. 6163–6174, 12 maio 2018.

[11] CHAFALE, Ayushi; DAS, Sera; KAPLEY, Atya. Valorization of oily sludge waste using biosurfactant-producing bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 39, n. 11, 25 set. 2023.

[12] KUMAR, Ajay et al. Microbial Biosurfactant: A New Frontier for Sustainable Agriculture and Pharmaceutical Industries. Antioxidants, v. 10, n. 9, p. 1472, 15 set. 2021.

[13] SAHITH, Veeramalli Naveen et al. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils/water for environmental remediation. Biodegradation, v. 37, n. 1, 1 dez. 2025.

CÓDIGO: SB1699

AUTOR: MARIA CLARA MEDEIROS RICARTE

ORIENTADOR: JUDNEY CLEY CAVALCANTE

TÍTULO: Variações e classificação das artérias circunflexas do úmero: um estudo cadavérico com implicações clínicas

Resumo

Introdução: As artérias circunflexa anterior (ACAU) e posterior do úmero (ACPU) são importantes para a vascularização do ombro e apresentam variações anatômicas de origem e trajeto, com relevância clínica. Objetivo: Caracterizar a origem e as variações anatômicas das artérias circunflexas do úmero em uma população local e propor uma classificação dos padrões identificados. Métodos: Foram dissecadas ACAU e ACPU de 84 membros do Laboratório de Anatomia da UFRN (Plataforma Brasil nº 7.074.706; CAAE 81505524.7.0000.5537), analisando-se origem, diâmetro, distância até a artéria braquial (AB) e trajetória. Resultados: A ACAU esteve ausente em 6 membros (7,14%), originou-se diretamente da terceira porção da artéria axilar (AA) em 48 (57,14%), de tronco comum com a ACPU em 23 (27,38%) e com a ACPU e artéria subescapular em 7 (8,33%). A ACPU esteve ausente em 1 membro (1,19%), originou-se da AA em 38 (31,92%), da AB em 2 (2,38%), de tronco comum com a ACAU em 23 (27,38%) e apresentou outras origens combinadas em 20 (23,80%). A ACPU atravessou o espaço quadrangular, exceto nos casos de origem braquial. A ACAU apresentou duplicação em 1 membro e bifurcação em 11. Os diâmetros médios foram 2,01 mm (ACAU) e 3,7 mm (ACPU), e as distâncias médias à AB, 40,1 mm e 39,4 mm, respectivamente. Conclusão: A ACAU mostrou-se mais frequentemente ausente, mais delgada, superior e menos variável que a ACPU. A identificação dessas variações contribui para o ensino anatômico e o planejamento cirúrgico.

Palavras-chave: Artérias circunflexas do úmero; Artéria axilar; Variações anatômicas;

TITLE: VARIATIONS AND CLASSIFICATION OF THE CIRCUMFLEX HUMERAL ARTERIES: A CADAVERIC STUDY WITH CLINICAL IMPLICATIONS

Abstract

Introduction: The anterior humeral circumflex artery (AHCA) and posterior humeral circumflex artery (PHCA) are important for shoulder vascularization and show

anatomical variations with clinical relevance. Objective: To characterize their origins and anatomical variations and classify the identified patterns. Methods: The AHCA and PHCA were dissected in 84 limbs from the Anatomy Laboratory of UFRN (Brazil Platform No. 7,074,706; CAAE 81505524.7.0000.5537). Origin, diameter, distance from the brachial artery (BA), and course were analyzed. Results: The AHCA was absent in 6 limbs (7.14%), originated from the third part of the axillary artery (AA) in 48 (57.14%), from a common trunk with the PHCA in 23 (27.38%), and with the PHCA and subscapular artery in 7 (8.33%). The PHCA was absent in 1 limb (1.19%), originated from the AA in 38 (31.92%), from the BA in 2 (2.38%), and from a common trunk with the AHCA in 23 (27.38%). Other origins occurred in 20 limbs (23.80%). The PHCA crossed the quadrangular space except when arising from the BA. The AHCA was duplicated in 1 limb and bifurcated in 11. Mean diameters were 2.01 mm (AHCA) and 3.7 mm (PHCA). Conclusion: The AHCA was more often absent, thinner, superior, and less variable than the PHCA. These findings contribute to anatomical knowledge and surgical planning.

Keywords: Circumflex humeral arteries; Axillary artery; Anatomical variations;

Introdução

A irrigação arterial do ombro e da fossa axilar apresenta organização anatômica complexa, sendo realizada principalmente por ramos da artéria axilar. Entre os vasos para a vascularização dessa região encontram-se as artérias circunflexa anterior do úmero (ACAU) e circunflexa posterior do úmero (ACPU), tradicionalmente descritas como ramos da terceira porção da artéria axilar.

A ACAU é caracterizada como um vaso de menor calibre que se dirige anteriormente ao colo anatômico do úmero. A ACPU, por sua vez, apresenta maior calibre e percorre posteriormente a região axilar, atravessando o espaço quadrangular juntamente com o nervo axilar. Ambas participam da irrigação do músculo deltoide e de estruturas relacionadas à articulação do ombro (Gardner et al., 1988).

Apesar da descrição anatômica clássica, as artérias circunflexas do úmero apresentam variações quanto à origem, ao trajeto e às relações com os demais ramos da artéria axilar. Entre essas variações destaca-se a formação de um tronco comum entre a ACAU e a ACPU, denominada artéria circunflexa comum do úmero ou truncus bicircumflexus. Revisões da literatura indicam ampla variação na frequência dessa configuração, com valores entre aproximadamente 8% e 32% (Brilakis et al., 2023).

A variabilidade anatômica desses vasos apresenta importância clínica. A ACPU pode participar de anastomoses com a artéria braquial profunda, contribuindo para a circulação colateral do membro superior. Entretanto, sua localização e seu trajeto também podem representar fatores relevantes durante intervenções cirúrgicas na região posterior do braço e do ombro (Martínez-Collado et al., 2025). Além disso, alterações na relação entre a ACPU, o nervo axilar e o espaço quadrangular podem apresentar implicações na síndrome do espaço quadrangular (Porcelline et al 2025).

Nesse contexto, a identificação e a caracterização das variações das artérias circunflexas do úmero são relevantes para o conhecimento anatômico e para áreas clínicas como

cirurgia, ortopedia, traumatologia e diagnóstico por imagem. A investigação em uma população local também permite comparar os padrões encontrados com aqueles descritos em diferentes populações.

O objetivo geral deste estudo foi compreender melhor a anatomia das artérias circunflexas do úmero e suas variações. Como objetivos específicos, buscou-se determinar a anatomia desses vasos em população local, caracterizar seus locais de surgimento e suas variações, realizar a caracterização morfométrica das origens das artérias e propor uma classificação para os padrões anatômicos identificados.

Metodologia

Foram analisados 84 membros provenientes do Laboratório de Anatomia Humana da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, nos quais foram dissecadas as artérias circunflexa anterior do úmero (ACAU) e circunflexa posterior do úmero (ACPU), considerando sua origem, diâmetro, distância em relação à artéria braquial (AB) e trajetória.

As regiões da axila e do ombro foram dissecadas com o objetivo de identificar as artérias circunflexa anterior e posterior do úmero e acompanhar seus trajetos em direção à profundidade do músculo deltoide. Foram registradas características anatômicas relacionadas ao local e à posição de surgimento, duplicações, formação de troncos comuns e outras variações.

As características anatômicas foram discutidas por dois pesquisadores, buscando aumentar a confiabilidade da identificação das estruturas e das classificações.

Para a análise morfométrica, foram realizadas medidas do diâmetro das artérias próximo aos seus locais de origem e da distância entre seus pontos de surgimento e o início da artéria braquial, definido pela borda inferior do músculo redondo maior. Cada medida foi realizada duas vezes por dois pesquisadores calibrados, sendo utilizada a média das mensurações.

Os dados analisados neste relatório correspondem aos 84 membros superiores com registros de dissecação concluídos disponíveis na base do projeto.

Resultados e Discussões

RESULTADOS

A ACAU esteve ausente em 6 dos 84 membros analisados (7,14%). Entre os membros nos quais o vaso estava presente, sua origem ocorreu diretamente na terceira porção da artéria axilar em 48 casos (57,14%), enquanto em 23 casos (27,38%) a artéria se

originou por meio de um tronco comum com a ACPU. Em 7 membros (8,33%), a ACAU originou-se de um tronco comum envolvendo a ACPU e a artéria subescapular.

Em relação à ACPU, foi observada ausência em 1 membro (1,19%). Quanto à origem, o vaso emergiu da terceira porção da artéria axilar em 38 membros (31,92%), da artéria braquial em 2 membros (2,38%) e de um tronco comum com a ACAU em 23 membros (27,38%). Em 1 membro (1,19%), a ACPU originou-se diretamente da artéria subescapular. Também foram identificados 2 casos (2,38%) em que a ACPU teve origem em um tronco comum com as artérias circunflexa da escápula e toracodorsal. Em 7 membros (8,33%), sua origem ocorreu a partir de um tronco comum com a ACAU e a artéria subescapular, enquanto em 10 membros (11,90%) a ACPU originou-se de um tronco comum com a artéria subescapular.

Quanto à trajetória, a ACPU atravessou o espaço quadrangular na maioria dos casos. As exceções corresponderam aos 2 membros em que a artéria se originou da artéria braquial, nos quais o vaso percorreu trajeto inferior ao espaço quadrangular, passando abaixo do músculo latíssimo do dorso.

A ACAU apresentou-se como vaso único na maioria dos membros. Foi identificada duplicação em 1 caso e bifurcação em 11 casos. Entre os vasos bifurcados, 4 apresentaram a divisão próxima à origem da artéria, enquanto em 7 a bifurcação ocorreu antes da penetração no músculo deltoide.

Na análise dos parâmetros morfométricos, o diâmetro médio na origem da ACAU foi de 2,01 mm, enquanto o da ACPU foi de 3,70 mm. A distância média entre a origem da ACAU e a artéria braquial foi de 40,1 mm, e entre a origem da ACPU e a artéria braquial foi de 39,4 mm. Em 22 membros, a ACAU apresentou-se em posição superior à ACPU.

De modo geral, os achados demonstraram diferenças quanto à frequência de ausência, padrões de origem, ramificação, trajetória e características morfométricas entre as artérias circunflexas anterior e posterior do úmero. A ACAU apresentou maior frequência de ausência e menor diâmetro médio, enquanto a ACPU apresentou maior diversidade nos padrões de origem e alterações de trajetória associadas à sua origem na artéria braquial.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram expressiva variabilidade anatômica das artérias circunflexas do úmero, particularmente quanto aos seus padrões de origem, trajeto e características morfométricas. Embora a descrição anatômica clássica estabeleça a artéria circunflexa anterior do úmero (ACAU) e a artéria circunflexa posterior do úmero (ACPU) como ramos da terceira porção da artéria axilar, os achados desta investigação evidenciam que esse padrão não é universal. Essa variabilidade é consistente com estudos anatômicos prévios que demonstram ampla diversidade na ramificação da artéria axilar e destacam a importância do reconhecimento dessas variações para procedimentos diagnósticos e cirúrgicos na região do ombro (Fontes et al., 2015).

A frequência das variações encontrada em diferentes estudos pode estar relacionada tanto às características das amostras quanto às diferenças metodológicas empregadas. Enquanto estudos cadavéricos identificam diretamente a origem e o trajeto vascular, investigações por imagem podem revelar padrões distintos, como demonstrado por Hattori et al., reforçando que a anatomia considerada “clássica” não representa necessariamente a configuração predominante em todas as populações. (Hattori et al, 2013)

Do ponto de vista clínico, essa variabilidade possui relevância para procedimentos envolvendo o ombro e a região proximal do úmero. A proximidade dessas artérias com o colo cirúrgico e com o espaço quadrangular torna seu conhecimento particularmente importante em abordagens cirúrgicas e na prevenção de lesões vasculares. Ademais, alterações na origem ou no trajeto desses vasos podem modificar sua relação com estruturas adjacentes e devem ser consideradas durante intervenções na região. Assim, os diferentes padrões descritos na literatura sustentam a necessidade de reconhecer as variações das artérias circunflexas do úmero como parte relevante do planejamento anatômico e cirúrgico (Elajnaf e Alashkham, 2020).

Conclusão

Os achados demonstram que as artérias circunflexas do úmero apresentam considerável variabilidade anatômica, especialmente quanto à origem, ao trajeto e às características morfométricas, evidenciando que o padrão descrito classicamente não contempla todas as configurações encontradas. As diferenças observadas em relação aos estudos da literatura reforçam a importância de reconhecer essas variações anatômicas, sobretudo da artéria circunflexa umeral posterior, devido à sua relação com o espaço quadrangular e com estruturas vasculonervosas adjacentes. Dessa forma, o conhecimento desses padrões contribui para uma melhor compreensão da vascularização do ombro e apresenta relevância para o planejamento e a execução de procedimentos cirúrgicos na região proximal do úmero, auxiliando na redução do risco de complicações vasculares e lesões iatrogênicas.

Referências

BRILAKIS, L.; TSAKOTOS, G.; LYKOUDIS, P. M.; PIAGKOU, M.; TROUPIS, T. Prevalence of axillary artery variants and their clinical significance: a scoping review. Cureus, v. 15, n. 10, e47809, 2023.

DE GARIS, C. F.; SWARTLEY, W. B. The axillary artery in white and negro stocks. American Journal of Anatomy, v. 41, n. 2, p. 354–397, 1928.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. O membro superior. In: GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. Anatomia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

MARTÍNEZ-COLLADO, P.; CASAÑAS-SINTES, J.; TARNAWSKI-ESPAÑOL, G. J.; LLUSÁ, M.; MORRO-MARTÍ, M. R. Communicating artery between posterior circumflex humeral artery and deep brachial artery: case report, literature review and clinical implications. Surgical and Radiologic Anatomy, v. 47, p. 17, 2025.

NETTER, F. H. Atlas de anatomia humana. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PORCELLINE, G.; BRIGO, A.; NOVI, M.; et al. Different patterns of neurogenic quadrilateral space syndrome: a case series of undefined posterior shoulder pain. Journal of Orthopaedics and Traumatology, v. 26, p. 1, 2025.

ELAJNAF, Mohamed; ALASHKHAM, Abduelmenem. Variations of the circumflex humeral arteries: a cadaveric study. Anatomy, v. 14, n. 3, p. 171–176, 2020. DOI: 10.2399/ana.20.825667.

FONTES, E. B.; PRECHT, B. L. C.; ANDRADE, R. C. L.; FERNANDES, R. M. P.; CISNE, R. Output relations of humeral circumflex arteries and its variations. International Journal of Morphology, v. 33, n. 3, p. 1171–1175, 2015. DOI: 10.4067/S0717-95022015000300058.

HUELKE, Donald F. Variation in the origins of the branches of the axillary artery. The Anatomical Record, v. 135, p. 33–41, 1959.

HATTORI, Y.; DOI, K.; SAKAMOTO, S.; SATBHAI, N. Anatomic variations in branching patterns of the axillary artery: a multidetector-row computed tomography angiography study. Journal of Reconstructive Microsurgery, v. 29, p. 531–536, 2013.

CÓDIGO: SB1708

AUTOR: ESTER DE MEDEIROS ROCHA

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de quitosana associadas à peçonha de Bothrops leucurus

Resumo

Os acidentes ofídicos constituem um relevante problema de saúde pública, destacando-se na Região Nordeste a espécie Bothrops leucurus, cuja peçonha (Bl) não integra o pool de produção do soro antiofídico nacional. Como alternativa para o aprimoramento de imunoadjuvantes e sistemas de liberação, este trabalho objetivou obter, caracterizar e avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana (NPQ) associadas à peçonha de B. leucurus (NPQ Bl). As NPQs foram sintetizadas por gelificação iônica e associadas à peçonha bruta por incorporação (0,5% a 10,0% m/m). A caracterização por DLS e ELS revelou tamanhos médios entre 91,5 e 126,6 nm, Potencial Zeta entre +20,0 e +25,8 mV e PDI de 0,402 a 0,433, além de Eficiência de Incorporação de até 99,2%. Nos ensaios de atividade hemolítica in vitro com eritrócitos humanos todas as amostras diminuíram significativamente ($p<0,0001$) a hemólise quando comparadas ao grupo 100% lise. A peçonha a 10% apresentou hemólise menor que 4%, enquanto as NPQs associadas ou não à peçonha apresentaram maior percentual de hemólise na primeira diluição (NPQ=30,57%; NPQ Bl 10%=43,28%; NPQ Bl 5%=44,34%; NPQ Bl 1%=54,26%; NPQ Bl 0.5%=64,14%). Nas diluições subsequentes, a hemólise diminuiu drasticamente (<6% para todas as amostras). Assim, o sistema nanoparticulado associado à peçonha de B. leucurus mostrou-se promissor para prosseguimento nos estudos como candidato a imunoadjuvante na produção de soro antiofídico.

Palavras-chave: Bothrops leucurus. Nanopartículas de Quitosana. Hemólise.

TITLE: Cytotoxicity evaluation of chitosan nanoparticles associated with Bothrops leucurus venom

Abstract

Snakebite envenoming represents a relevant public health problem, with Bothrops leucurus being a particularly important species in Northeastern Brazil, whose venom is not included in the national antivenom production pool. As an alternative for improving immunoadjuvants and drug delivery systems, this study aimed to obtain, characterize,

and evaluate the cytotoxicity of chitosan nanoparticles (CNPs) associated with B. leucurus venom. CNPs were synthesized by ionic gelation and associated with crude venom (0.5% to 10.0% w/w). Physicochemical characterization by DLS and ELS revealed mean particle sizes ranging from 91.5 to 126.6 nm, Zeta potential between +20.0 and +25.8 mV, PDI from 0.402 to 0.433, and Encapsulation Efficiency up to 99.2%. In in vitro hemolytic activity assays with human erythrocytes, all samples significantly reduced hemolysis ($p<0.0001$) compared to the 100% group. Venom alone at 10% exhibited a hemolysis rate of less than 4%, whereas CNPs, whether associated with venom or not, showed a higher percentage of hemolysis in the first dilution (CNP=30.57%; CNP Bl 10%=43.28%; CNP Bl 5%=44.34%; CNP Bl 1%=54.26%; CNP Bl 0.5%=64.14%). In subsequent dilutions, this hemolytic percentage decreased drastically (<6% for all samples). Therefore, the development of this nanoparticulate system associated with B. leucurus venom proved promising for continuing studies toward a future immunoadjuvant candidate for antivenom production. (1464 caracteres)
* Keywords (máx. 70 cara

Keywords: Bothrops leucurus. Chitosan Nanoparticles. Hemolysis.

Introdução

Os acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública não só pela frequência com que ocorrem, mas também pela gravidade dos sinais clínicos que causam (Ministério da Saúde, 2024). Nesse contexto, as serpentes do gênero Bothrops, popularmente conhecidas como jararacas, representam o maior interesse médico devido à prevalência de casos no território brasileiro, visto que são encontradas em diversas regiões do país, sendo a região Nordeste a mais acometida com 10.187 notificações (Ministério da Saúde, 2024). Embora os números alarmantes sejam preocupantes, eles podem não refletir a realidade completa devido à subnotificação relacionada à dificuldade de acesso ou inexistência dos serviços de saúde em algumas regiões do país (OMS, 2019). A espécie Bothrops leucurus, popularmente conhecida como “jararaca-de-cauda-branca”, é uma serpente endêmica das regiões Sudeste e Nordeste brasileiro, sendo a maior responsável pelos acidentes ofídicos na região Nordeste. Apesar disso, sua peçonha não é utilizada no pool de produção do soro antiofídico distribuído em nível nacional. Nesse cenário, o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de antígenos e imunoadjuvantes constitui uma estratégia promissora para otimizar a imunização e a produção de imunoglobulinas heterólogas. As nanopartículas de quitosana (NPQs) destacam-se nesse campo por serem obtidas a partir de um biopolímero biodegradável, biocompatível e mucoadesivo, capaz de promover a liberação controlada de antígenos proteicos e de exercer efeito imunoadjuvante, estimulando a resposta imune humoral e celular (Rocha-Soares et al., 2012, 2017, 2018; Gláucia-Silva et al., 2018). Dessa forma, este estudo propõe a síntese, caracterização e avaliação citotóxica inicial (em eritrócitos) de nanopartículas de quitosana associadas à peçonha de B. leucurus, visando estabelecer uma etapa prévia fundamental para futuras abordagens imunológicas e biotecnológicas.

Metodologia

Obtenção da peçonha: A peçonha liofilizada de B. leucurus (BlV) foi obtida do Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro, Brasil), com uso científico aprovado pelo SISGEN (Processo ABB2A47). A peçonha foi armazenada a -20 °C, reconstituída e a concentração proteica foi determinada pelo ensaio de Bradford utilizando albumina como padrão.
Obtenção das nanopartículas: As NPQs foram produzidas por gelificação iônica. Preparou-se uma solução de quitosana 0,1% (m/v) em ácido acético 0,175% (v/v) (pH=4,0, volume final de 5 mL) e uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) 0,1% (m/v) em água destilada (pH=9,0, volume final de 2 mL). A solução de TPP foi adicionada por gotejamento à quitosana sob agitação de 300 rpm a 25 °C por 30 minutos, formando uma dispersão opalescente (7 mL). Para a incorporação da peçonha de B. leucurus (estoque 1 mg/mL), alíquotas foram adicionadas à solução de TPP antes do gotejamento na quitosana, nas proporções finais de 0,5%, 1,0%, 5,0% e 10,0% m/m em relação à massa de quitosana.
Caracterização físico-química: O potencial zeta foi determinado por espalhamento eletroforético de luz (ELS) no equipamento ZetaSizer NanoZS (Malvern, Reino Unido), aplicou-se campo de ~5,9 V/cm. O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) foram mensurados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) a 659 nm, ângulo de 173° e 25 °C. As análises foram realizadas em triplicata (média ± desvio-padrão). A Eficiência de Incorporação (EI%) foi obtida por separação das NPQs por centrifugação (14.000 rpm, 30 min, 4 °C) e quantificação da proteína livre no sobrenadante pelo método de Bradford, calculada pela relação entre a proteína total adicionada subtraída da fração livre dividida pela proteína total adicionada e multiplicada por 100.
Atividade hemolítica: O concentrado de hemácias foi obtido de doadores saudáveis (CEP/HUOL/UFRN nº 3.127.063). Para a avaliação citotóxica, 20 µL de suspensão de eritrócitos humanos a 20% (v/v) foram incubados a 37 °C por 60 min com 230 µL das amostras (Bl 10%, NPQ, NPQ Bl 0.5%, 1%, 5% e 10%) em tampão salino fosfato (PBS), puras e em diluições seriadas. Após centrifugação (3.500 rpm, 5 min), a leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Triton-X 100 (1%) e PBS foram utilizados como controles positivo (100% lise) e negativo (0% lise), respectivamente (média ± erro-padrão, n=3).
Análise estatística: Experimentos realizados em triplicata. Cálculos de desvio-padrão no Microsoft Excel e análises por ANOVA one-way seguidas pelo pós-teste de Tukey no GraphPad Prism v8.01.

Resultados e Discussões

As nanopartículas de quitosana obtidas apresentaram características físico-químicas condizentes com os parâmetros desejados para sistemas de liberação e adjuvantes biológicos. O Potencial Zeta das formulações variou entre +20,0 mV e +25,8 mV, enquadrando-se na faixa ideal descrita pela literatura para sistemas de quitosana (+20 mV a +30 mV). Essa carga superficial positiva assegura a repulsão eletrostática entre as partículas, mitigando fenômenos de agregação e favorecendo a estabilidade coloidal do sistema. O tamanho médio hidrodinâmico permaneceu próximo a 100 nm (variando de 91,5 a 126,6 nm). Na literatura, essa faixa de tamanho nanométrico é compatível com sistemas frequentemente empregados para entrega de antígenos e vacinas, propriedade relevante para a modulação da resposta imune à peçonha (Rocha Soares et al., 2012, 2017, 2018; Gláucia-Silva et al., 2018). A Eficiência de incorporação apresentou valores elevados nas NPQs nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 5,0% da peçonha de B.

leucurus (99,2%, 98,7% e 93,2%, respectivamente). Na concentração mais elevada (10,0%), observou-se uma redução nessa eficiência de encapsulamento para 80,6%, sugerindo um ponto de saturação da matriz polimérica frente à carga proteica aplicada (Gan; Wang, 2007). Em relação ao Índice de Polidispersão (PDI), todas as amostras apresentaram valores na faixa de 0,40 a 0,43 (PDI > 0,2). Embora a literatura estabeleça valores de PDI < 0,2 como ideais para sistemas estritamente monodispersos, a faixa obtida indica um sistema polidisperso modesto, o que pode ser atribuído à heterogeneidade molecular intrínseca da peçonha bruta de B. leucurus ou a uma leve variação na distribuição de tamanho da matriz polimérica. Partindo para o ensaio hemolítico, o processo de diluição das nanopartículas teve de ser alterado devido à forma de preparo das NPQs, pois em sua formulação são utilizados reagentes que apresentam potencial hemolítico elevado, como o ácido acético. Ao analisar o perfil de toxicidade da peçonha bruta e nas concentrações testadas, é possível observar o perfil hemolítico em comparação a suas diluições. A peçonha bruta livre na maior concentração testada (Bl 10% equivalente) apresentou baixa atividade hemolítica (< 4%). Por outro lado, as formulações de NPQ não diluídas (fração 1) induziram lise eritrocitária parcial a acentuada (NPQ= 30,57%; NPQ Bl 10% = 43,28%; NPQ Bl 5%= 44,34%; NPQ Bl 1%= 54,26%; NPQ Bl 0.5%= 64,14%). Os resultados sugerem que essa toxicidade eritrocitária inicial decorra principalmente da acidez residual (ácido acético do veículo de síntese), visto que a diluição sequencial e o tamponamento em PBS (pH 7,4) reduziram significativamente a hemólise para níveis negligenciáveis (< 6%) em todas as amostras testadas. Contudo, a confirmação definitiva dessa hipótese requererá ensaios futuros com controles específicos do veículo sem as nanopartículas. Embora a redução da hemólise em PBS seja um indicativo favorável de segurança hematológica inicial, a afirmação de biocompatibilidade para aplicação in vivo ainda depende da avaliação de outros parâmetros essenciais, como osmolaridade, pH final, citotoxicidade em linhagens celulares e aprovação em comitê de ética animal.

Conclusão

O estudo permitiu obter nanopartículas de quitosana associadas à peçonha de Bothrops leucurus com diâmetros nanométricos (< 130 nm), potencial zeta positivo e elevada eficiência de incorporação proteica (até 99,2% nas menores concentrações). Nos ensaios hematológicos, a peçonha isolada apresentou baixo potencial hemolítico e o ajuste nas condições de diluição em tampão salino reduziram drasticamente a lise eritrocitária provocada pela acidez do veículo de síntese nas amostras não diluídas. Os resultados estabelecem parâmetros metodológicos essenciais e mostram que o sistema é promissor para o prosseguimento dos estudos de estabilidade e citotoxicidade celular necessários antes de eventuais etapas in vivo para o desenvolvimento de um futuro imunoadjuvante.

Referências

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 59, n. 1, p. 24–34, 2007.

GLÁUCIA-SILVA, F. et al. A biotechnological approach to immunotherapy: Antivenom against Crotalus durissus cascavella snake venom produced from

biodegradable nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules, v. 120, p. 1917– 1924, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.203.

CÓDIGO: SB1714

AUTOR: KLAUS AUGUSTUS RAMOS REINIGER

ORIENTADOR: UMBERTO LAINO FULCO

TÍTULO: Dinâmica e Inibição Alostérica da RdRp de Pneumovírus: Integrando Mecânica Quântica, (Co)enovelamento por IA e Conservação de Sequências

Resumo

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e o Metapneumovírus humano (hMPV) carecem de antivirais específicos. O MRK-1 atua como potente inibidor alostérico da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), mas a escassez de estruturas de pneumovírus complexadas a ligantes limita a compreensão de seus mecanismos catalíticos. Integraram-se mecânica quântica (MFCC-DFT), análise de sequências (MSA, filogenia e entropia de Shannon) e predições de (co)enovelamento por IA. Mapearam-se resíduos potencialmente implicados na comunicação alostérica, demonstrando que o rearranjo no sítio de ligação induz mudança conformacional com variações energéticas em pares 100% conservados (e.g., LEU1372_RSV/LEU1297_hMPV: -7,78/-3,97 kcal/mol; PHE1385_RSV/PHE1310_hMPV: -10,33/-5,66 kcal/mol). Resíduos de maior afinidade situam-se adjacentes ao Motivo E do domínio PRNTase (mantendo o esqueleto estrutural), com posições internas conferindo estabilidade termodinâmica. O perfil oscilatório da entropia de Shannon na polimerase indica que a diversidade sequencial preserva mecanismos essenciais e viabiliza transições conformacionais por regiões flexíveis. A interface do tetrâmero da fosfoproteína revelou-se moduladora da RdRp, e a modelagem do Motivo F do domínio RdRp esclareceu arquiteturas de elongação. Coletivamente, o MRK-1 bloqueia transições conformacionais críticas, refinando a topologia da RdRp e orientando futuros fluxos de trabalho com redes por ensemble e complexos com M2-1.

Palavras-chave: Química quântica; filogenia; entropia; pneumovírus; enovelamento; IA

TITLE: Pneumovirus RdRp Dynamics and Allosteric Inhibition: Integrating Quantum Mechanics, AI (Co)folding and Sequence Conservation

Abstract

Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Human Metapneumovirus (hMPV) lack targeted antiviral therapeutics. MRK-1 acts as a potent allosteric inhibitor of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), but the general scarcity of ligand-bound pneumovirus structures limits the understanding of its catalytic mechanisms. Quantum mechanics (MFCC-DFT), sequence analysis (MSA, phylogeny, and Shannon entropy), and AI-based (co)folding predictions were integrated. Residues potentially implicated in allosteric communication were mapped, demonstrating that rearrangement within the binding site induces a conformational change with energetic shifts across 100% conserved pairs (e.g., LEU1372_RSV/LEU1297_hMPV: -7.78/-3.97 kcal/mol; PHE1385_RSV/PHE1310_hMPV: -10.33/-5.66 kcal/mol). Highest-affinity residues map adjacent to Motif E of the PRNTase domain (maintaining the structural scaffold), with interior positions conferring thermodynamic stability. The oscillating Shannon entropy profile along the polymerase indicates that sequence diversity preserves essential enzymatic mechanisms and enables flexible region-driven conformational transitions. The phosphoprotein tetramer interface proved to modulate the RdRp, and modeling Motif F of the RdRp domain elucidated elongation-prone architectures. Collectively, MRK-1 blocks critical conformational transitions, refining RdRp topology and guiding future workflows with ensemble contact networks and M2-1-containing complexes.

Keywords: Quantum chemistry; phylogeny; entropy; pneumovirus; folding; AI

Introdução

O vírus sincicial respiratório (VSR) e o metapneumovírus humano (hMPV) (Pneumoviridae, ordem Mononegavirales) representam grave impacto à saúde pública global por causarem infecções respiratórias agudas severas em lactentes, idosos e imunocomprometidos (DU et al., 2023; WANG et al., 2024; TISCHER et al., 2022). O manejo clínico baseia-se em suporte, dada a escassez de antivirais e a eficácia restrita das imunoprofilaxias e vacinas em infecções estabelecidas e neonatos prematuros (RENAUD; ENGLUND, 2016).

A RNA polimerase (proteína L) destaca-se como alvo promissor para antivirais de ação direta de amplo espectro devido à sua conservação evolutiva (KARIM et al., 2023). O inibidor não nucleosídico (INN) MRK-1 (Figura 1) atua contra VSR e hMPV ligando-se a um sítio alostérico conservado no domínio PRNTase (motivos B, D e E) (KLEINER et al., 2023; ORABY et al., 2024; OGINO; GREEN, 2019). Essa ligação bloqueia o início da síntese e a elongação inicial do RNA, sendo o mecanismo proposto a restrição de transições conformacionais essenciais à catálise (LIANG, 2020; VELTHUIS et al., 2021).

Contudo, a flexibilidade intrínseca e a extensão de L e da fosfoproteína (P) limitam a resolução por criomicroscopia eletrônica (cryo-EM), restando não resolvidos domínios fundamentais como o conector, a MTase e a porção C-terminal (KLEINER et al., 2023). Múltiplos fatores — tais como a fosforilação de P, cofatores e a interação com M2-1 — modulam estados funcionais associados a perfis energéticos distintos (BARIK; BANERJEE, 1992; CAO et al., 2020; MASON et al., 2003). Para contornar tais lacunas, estabelece-se uma abordagem computacional integrada, na qual cálculos de mecânica quântica via método MFCC-DFT quantificam as interações moleculares

resíduo a resíduo ab initio com precisão eletrônica superior à mecânica molecular (ALBUQUERQUE et al., 2014; VIANNA et al., 2019), enquanto Redes de Interação de Resíduos (RIRs) decodificam a topologia macromolecular em grafos para mapear a interface funcional L–P (LIANG et al., 2020; BEGUE et al., 2026). Paralelamente, análises evolutivas por alinhamentos múltiplos (MISTRY et al., 2021) e filogenia (RANWEZ et al., 2011; ZOU et al., 2024) correlacionam conservação e flexibilidade conformacional mediante a entropia de Shannon, complementando predições de (co)enovelamento por inteligência artificial, como AlphaFold 3 (ABRAMSON et al., 2024) e Boltz-2 (PASSARO et al., 2025), as quais viabilizam a elucidação estrutural de regiões desordenadas e complexadas (JUMPER et al., 2021).

Objetivo Geral:
Caracterizar quantitativamente o perfil termodinâmico e a comunicação alostérica do sítio do MRK-1 no domínio PRNTase da proteína L de VSR e hMPV, correlacionando o impacto energético às transições catalíticas de polimerases de pneumovírus e determinando aminoácidos hubs para a sua execução.

Objetivos Específicos:

(i) Determinar, via cálculos MFCC-DFT, a afinidade energética resíduo a resíduo no sítio do MRK-1 em VSR e hMPV, integrando-a às interações intermoleculares verificadas;

(ii) Caracterizar regiões e aminoácidos com implicações funcionais e essenciais para a ligação a MRK-1, correlacionando a energia de resíduos críticos (e.g., ILE1381_VSR) a mutações de resistência (e.g., I1381T);

(iii) Avaliar regiões implicadas em transições conformacionais e estabilização estrutural mediante o perfil de entropia de Shannon;

(iv) Analisar a conservação da interface L–tetrâmero de fosfoproteína (L–4P) na modulação da RdRp;

(v) Predizer arranjos estruturais em regiões não resolvidas por cryo-EM e avaliar a acurácia de ferramentas de (co)enovelamento por IA.

Metodologia

Para a caracterização comparativa dos perfis estruturais, dinâmicos e energéticos entre polimerases filogeneticamente próximas (VSR e hMPV) e divergentes (VSV), as sequências FASTA foram obtidas do PDB (códigos 8FPI e 8FPJ) e do NCBI GenBank (acessos AAA48441.1 e WEF36685.1 para L e P de VSV) (SAYERS et al., 2025). Os alinhamentos múltiplos de sequências (AMS) foram gerados via ClustalOmega na plataforma EMBL-EBI Job Dispatcher (SIEVERS et al., 2011; MADEIRA et al., 2024)

e MAFFT 7 (KATOH; STANDLEY, 2013; KATOH, 2002) sob a função add com métrica de distância 6merpair, estabelecendo a correspondência posicional de resíduos entre VSR e hMPV.

As estruturas de criomicroscopia eletrônica (cryo-EM) da polimerase L truncada do VSR complexada ao MRK-1 (Ltrunc) e da polimerase L do hMPV, ambas associadas ao tetrâmero da fosfoproteína (P), foram recuperadas do PDB sob os códigos 8FPI (resolução de 2,52 Å) e 8FPJ (resolução de 2,74 Å) (Figura 2). Em virtude da vitrificação em orientações aleatórias e da menor razão sinal-ruído inerente à cryo-EM, as coordenadas atômicas de hidrogênios e moléculas de água de solvatação foram adicionadas computacionalmente após a estabilização do esqueleto polipeptídico (backbone). O ligante MRK-1 (Figura 1) foi fragmentado em quatro regiões (I–IV), tendo seu estado preferencial de protonação em pH 7,4 estimado via MarvinSketch. O pKa e o estado de ionização das cadeias laterais dos resíduos foram calculados no servidor Propka Online 2.0 (SØNDERGAARD et al., 2011). Subsequentemente, os complexos foram submetidos à otimização geométrica por mecânica molecular com restrição de posição do backbone sob o campo de força CHARMm (MOMANY; RONE, 1992).

As energias de interação receptor-ligante foram calculadas quanticamente segregando-se os resíduos em raios esféricos de 2,0 Å a 10,0 Å (passo de 0,5 Å) em relação ao MRK-1. Para cada resíduo (Ri) dentro do raio, a energia de interação individual (IEi) com o ligante (L) foi calculada pelo método de Fracionamento Molecular com Capas Conjugadas (MFCC) (WANG et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). O esquema emprega capas conjugadas hidrogenadas N-terminais (Ci) e C-terminais (C*i) para neutralizar as ligações peptídicas clivadas, reproduzindo a polarização e o ambiente dielétrico local com alta acurácia eletrônica (VIANNA et al., 2019; ZHANG, 2017):

$$IEi = E(L - CiRiCi^*) - E(CiRiCi^*) - E(L - CiCi^*) + E(CiCi^*)$$

onde E representa a energia total de cada subsistema. Os cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foram conduzidos no Gaussian 16 empregando o funcional meta-GGA B97D com correção de dispersão (GRIMME, 2006; OVALLE; MALARDIER-JUGROOT, 2022) e a base 6-311+G(d,p). Os efeitos de solvatação implícita foram modelados pelo método CPCM/SCRF (SILVA et al., 2024), adotando-se constantes dielétricas $\varepsilon = 10$ (núcleo hidrofóbico interno) e $\varepsilon = 40$ (solvente aquoso periférico) (VICATOS et al., 2009; AMIN; KÜPPER, 2020; DANTAS et al., 2015). A afinidade global foi obtida pelo somatório cumulativo E(r), considerando-se convergido o sistema com variação energética inferior a 10% em três raios consecutivos (BARBOSA et al., 2021).

O servidor RING (DEL CONTE et al., 2024) mapeou as Redes de Interação de Resíduos (RIRs) e contatos intermoleculares entre L, MRK-1 e os monômeros de P nas estruturas otimizadas, convertendo as forças químicas em grafos topológicos. A filogenia da polimerase L foi inferida no TaxOnTree (SAKAMOTO; ORTEGA, 2020) via buscas BLAST no UniProt Reference Proteomes, alinhamento por MUSCLE, remoção de sítios espúrios por TrimAl e reconstrução por FastTree, aplicando-se o limiar de 50% de identidade para mitigar artefatos decorrentes da heterogeneidade evolutiva entre domínios catalíticos e conectores flexíveis (OGINO; GREEN, 2019). A partir desses dados, geraram-se dois bancos no GenBank: de larga escala (>1000

sequências, alinhadas por MAFFT 7 via 6merpair) e focado (>50 sequências, via localpair), computando-se a entropia de Shannon resíduo a resíduo para mapear a flexibilidade estrutural.

Para modelar a dinâmica de enovelamento e a ação do MRK-1, utilizou-se o RSV como organismo de referência. Das sequências obtidas do PDB 8FPI, foram suprimidas as caudas sintéticas 3xFLAG (em L) e 6xHis (em P) cliváveis por proteases (KLEINER et al., 2023). O AlphaFold 3 (ABRAMSON et al., 2023) gerou cinco modelos para a RSV L completa e para o complexo L + 4P. O Boltz-2 (PASSARO et al., 2023) foi empregado para predizer a RSV L monomérica e para ensaios de (co)enovelamento (co-folding) de RSV L completa e RSV Ltrunc com o MRK-1 via código SMILES. Os modelos foram validados por métricas de RMSD (frente ao 8FPI), ranking score, escore de confiança, pTM, ipTM e análise estereoquímica no RevelioPlots (FERNANDES et al., 2026), com coloração baseada em pLDDT. Por fim, os modelos de melhor desempenho foram sobrepostos e contrastados diretamente contra a estrutura experimental 8FPI.

Resultados e Discussões

Domínios estruturais e motivos conservados foram mapeados a partir de alinhamentos múltiplos de sequências para correlacionar sequências bem caracterizadas de VSV e VSR a outros pneumovírus, fundamentando-se nos estudos estruturais de referência (CAO et al., 2020; KLEINER et al., 2023; OGINO; GREEN, 2019). Enquanto a polimerase L exibe regiões com acentuada conservação funcional e estrutural a despeito de eventuais divergências de sequência, a fosfoproteína (P) apresenta maior variabilidade conformacional, adotando diferentes estados oligoméricos, múltiplos parceiros de ligação (como a proteína M2-1 em pneumovírus) e limites de domínios menos definidos. Notavelmente, o domínio estimulatório de L (L-SR) caracterizado em VSV sobrepõe-se expressivamente à região de ligação de M2-1 (M2-1-BR), um elemento exclusivo de pneumovírus.

Após a recuperação das estruturas dos complexos de L ligados ao MRK-1 em VSR e hMPV, avaliaram-se os estados de protonação dos resíduos, com foco nas posições sepultadas no interior da matriz proteica. Conforme os cálculos de pKa, o ligante MRK-1 (Figura 1) apresenta carga líquida neutra em pH fisiológico, exibindo protonação positiva no nitrogênio III[N1(H+)] e ionização negativa no nitrogênio II[N3-]. A análise energética radial no bolsão de ligação demonstrou rápida convergência termodinâmica (Figura 3), consolidando-se no raio de 4,0 Å para o complexo de VSR (sob ambas as constantes dielétricas, $\varepsilon = 10$ e $\varepsilon = 40$), de 5,0 Å para hMPV sob $\varepsilon = 10$ e de 4,5 Å sob $\varepsilon = 40$. Os valores de energia de interação global calculados no raio assintótico de r = 10,0 Å foram de -82,86 kcal/mol ($\varepsilon = 10$) e -75,04 kcal/mol ($\varepsilon = 40$) para o VSR, e de -72,44 kcal/mol ($\varepsilon = 10$) e -65,61 kcal/mol ($\varepsilon = 40$) para o hMPV. A decomposição radial em VSR revelou que o núcleo de afinidade intermolecular concentra-se estritamente nos raios basais de 2,0 Å a 3,0 Å, evidenciando que forças de longo alcance desempenham papel secundário na modulação direta do fármaco, enquanto em hMPV as forças atrativas primárias expandem-se de r = 2,0 Å a r = 3,5 Å. A análise complementar sob matriz hidrofóbica ($\varepsilon = 10$) apontou resíduos periféricos que sofrem amplificação em

sua energia atrativa absoluta, como GLU1374_RSV (-1,37 kcal/mol) / GLU1299_hMPV (-2,08 kcal/mol), ARG1123_RSV (-0,40 kcal/mol), GLN1295_hMPV (-1,10 kcal/mol) e ARG934_hMPV (-0,59 kcal/mol). Em contrapartida, outros aminoácidos acentuam seu caráter repulsivo, a exemplo de LYS1375_RSV (+0,81 kcal/mol) / ARG1300_hMPV (+0,86 kcal/mol), GLU1348_RSV (+0,58 kcal/mol), GLU1194_hMPV (+0,61 kcal/mol, situado no priming loop da PRNTase) e LYS1164_hMPV (+0,71 kcal/mol). No VSR, esses resíduos concentram-se na vizinhança do Motivo E da PRNTase, ao passo que em hMPV distribuem-se adjacentes aos Motivos B e E.

A acomodação do MRK-1 no domínio PRNTase de ambos os vírus é estabilizada predominantemente por contatos hidrofóbicos entre os anéis aromáticos do ligante e cadeias laterais alquílicas (e.g., VAL1384_RSV/VAL1309_hMPV e LEU1372_RSV/LEU1297_hMPV) ou aromáticas (e.g., PHE1385_RSV/PHE1310_hMPV e HIS1338_RSV/HIS1263_hMPV). Redes de ligações de hidrogênio convencionais e não convencionais fornecem estabilização adicional, mediadas prioritariamente por resíduos carregados (e.g., GLU1379_RSV/GLU1304_hMPV e ASN1294_hMPV) e por carbonilas da cadeia principal (e.g., ILE1381_RSV/ILE1306_hMPV).

Sob a constante dielétrica representativa do meio solvatado (ε = 40), o escalonamento dos resíduos com maior afinidade atrativa no complexo VSR–MRK-1 revelou a hierarquia PHE1385_RSV (-10,33 kcal/mol) > VAL1384_RSV (-8,24) > LEU1372_RSV (-7,78) > HIS1338_RSV (-6,53) > ILE1381_RSV (-6,06) > GLU1379_RSV (-3,53) > ARG1345_RSV (-2,80). Em contraste, as interações repulsivas mais expressivas foram ASP1380_RSV (+4,25 kcal/mol) > ILE1383_RSV (+1,20) > ILE1371_RSV (+0,53), estando esses resíduos mapeados na Figura 4A. Avaliando-se a contribuição fragmentada do fármaco, a Região I (grupo 4-ciclopropoxi-3-metoxibenzoíla; Figura 5A) estabelece interações atrativas cruciais com VAL1384_RSV, HIS1338_RSV, ARG1345_RSV e ILE1381_RSV. O anel benzóico forma ligação pi-alquil altamente favorável com a cadeia lateral de VAL1384_RSV a 4,70 Å, além de contatos alquil-alquil com os grupos ciclopropoxi (5,41 Å) e metoxi (4,21 Å). O anel imidazólico de HIS1338_RSV realiza empilhamento pi-pi paralelo a 4,15 Å e contato pi-alquil a 3,50 Å com o grupo benzoíla. ARG1345_RSV estabelece interação alquil-alquil a 5,38 Å com a porção ciclopropoxi, enquanto ligações de hidrogênio com I[O1] e I[O2] não se consolidam devido a distâncias superiores ao ponto de corte (4,1 Å e 3,8 Å vs. 3,1 Å) e ao estado desprotonado do resíduo. ILE1381_RSV participa mediante ligação de hidrogênio não convencional entre o oxigênio de seu backbone e o átomo I[C17(H)] coplanar ao anel aromático (2,30 Å).

A Região II (grupo hidrazida; Figuras 5B e 5C) concentra a maior densidade de interações com a polimerase do VSR, mediando contatos favoráveis com PHE1385_RSV (-10,33 kcal/mol via ligação de hidrogênio com II[O3] a 1,93 Å) e ILE1381_RSV (-6,06 kcal/mol via ligação de hidrogênio com II[N4(H)] a 2,30 Å e com II[O4] a 2,94 Å). As repulsões observadas decorrem de desfavorecimento eletrostático aceptor-aceptor entre o carboxilato de ASP1380_RSV e o átomo II[O4] a 2,95 Å (parcialmente compensado por ligação de H não convencional de Cα-H com II[O3] a 2,18 Å), e da repulsão da carbonila de ILE1383_RSV frente ao nitrogênio aniônico II[N3-]. VAL1384_RSV e HIS1338_RSV mantêm contatos de hidrogênio não convencionais com II[O3] (2,94 Å) e II[O4] (2,80 Å). Na Região III (anel piridinil

central; Figura 5D), destacam-se contatos atrativos com LEU1372_RSV (-7,78 kcal/mol, mediado por forte ligação de hidrogênio com III[N1(H)] a 1,61 Å e pi-alquil a 5,37 Å), GLU1379_RSV (-3,53 kcal/mol via ligações C-H a 2,34 Å e 3,06 Å) e ILE1381_RSV (-6,06 kcal/mol via pi-alquil a 5,23 Å). Repulsões pontuais ocorrem em ILE1371_RSV (+0,53 kcal/mol) por desfavorecimento doador-doador frente a III[N1(H)] e em ILE1383_RSV (+1,20 kcal/mol). Por fim, a Região IV (anel fluorofenila; Figura 5E) consolida interações de ancoragem secundária em PHE1385_RSV (-10,33 kcal/mol, por empilhamento pi-pi em formato de T a 4,79 Å), LEU1372_RSV (-7,78 kcal/mol, via pi-alquil a 4,98 Å) e ILE1383_RSV (+1,20 kcal/mol, via pi-alquil coplanar a 5,06 Å).

No complexo hMPV–MRK-1 (Figura 6B), os resíduos com contribuições atrativas mais expressivas seguiram a ordem ASN1294_hMPV (-10,31 kcal/mol) > ILE1306_hMPV (-6,92) > PHE1310_hMPV (-5,66) > HIS1263_hMPV (-4,81) > LEU1297_hMPV (-3,97) > VAL1309_hMPV (-3,93) > ASP1305_hMPV (-2,84) > GLU1304_hMPV (-2,50), ao passo que as interações desfavoráveis restringiram-se a LEU1308_hMPV (+3,54 kcal/mol) > MET1347_hMPV (+1,27). Na Região I (Figura 6A), MET1347_hMPV (+1,27 kcal/mol) estabelece interação pi-enxofre com o anel benzóico a 4,74 Å e contato alquil-alquil com o grupo ciclopropil a 4,79 Å, enquanto HIS1263_hMPV (-4,81 kcal/mol) forma interação pi-pi com o grupo benzoíla a 4,34 Å e pi-alquil com o grupo metoxi a 5,00 Å, e VAL1309_hMPV (-3,93 kcal/mol) realiza contato pi-alquil a 5,07 Å. Na Região II (Figura 6B), ILE1306_hMPV (-6,92 kcal/mol) destaca-se por ligação de hidrogênio a 2,68 Å com II[N4(H)] e atração por II[N3-], HIS1263_hMPV (-4,81 kcal/mol) estabelece ligações de hidrogênio com II[O3] (2,53 Å) e II[O4] (2,21 Å), e VAL1309_hMPV (-3,93 kcal/mol) liga-se a II[O3] por ligação de H não convencional (2,62 Å). Diferentemente do VSR, ASP1305_hMPV (-2,84 kcal/mol) assume conformação favorável, enquanto em LEU1308_hMPV (+3,54 kcal/mol) a repulsão eletrostática com II[N3-] a 2,76 Å sobrepõe-se à ligação de hidrogênio formada com II[N4(H)] a 2,67 Å. Na Região III (Figura 6C), ASN1294_hMPV (-10,31 kcal/mol) estabelece uma densa rede de ligações de hidrogênio com o nitrogênio protonado III[N1(H)], constituindo a interação isolada mais forte em todo o complexo de hMPV, sendo complementada por contatos C-H em GLU1304_hMPV (-2,50 kcal/mol), contatos pi-alquil e alquil-alquil em ILE1306_hMPV (-6,92 kcal/mol, a 3,64 Å e 3,99 Å) e interação pi-alquil em LEU1297_hMPV (-3,97 kcal/mol a 5,56 Å). Na Região IV (Figura 6D), PHE1310_hMPV (-5,66 kcal/mol) ancora o anel fluorofenila via empilhamento pi-pi em T a 5,74 Å e pi-alquil a 4,05 Å, além de contatos pi-alquil adicionais em LEU1297_hMPV (-3,97 kcal/mol a 5,06 Å) e ILE1306_hMPV (-6,92 kcal/mol a 5,05 Å). Paralelamente, a interface macromolecular entre L e o tetrâmero 4P mostrou-se estritamente conservada entre VSR e hMPV, exibindo ampla correspondência posicional direta entre as faixas de resíduos em ambas as espécies.

A inferência filogenética pelo TaxOnTree (Figura 7) permitiu delinear a história evolutiva de pneumovírus e construir dois bancos de sequências do GenBank (Figura 8). As médias de entropia de Shannon por resíduo (valores brutos/desduplicados) foram de 0,57/0,55 bits para o banco de larga escala e de 0,94/0,89 bits para o banco focado. O domínio PRNTase apresentou a menor entropia média de toda a polimerase (0,53/0,51 e 0,90/0,87 bits), enquanto os domínios CD, MTase e CTD, reconhecidos por sua elevada plasticidade e desordem intrínseca, exibiram escores expressivamente elevados. As curvas de média móvel evidenciam um perfil oscilatório característico, no qual a diversidade de sequência é modulada para blindar os sítios enzimáticos críticos:

subdomínios catalíticos e motivos conservados de RdRp apresentam valores de entropia progressivamente inferiores à média global da proteína. A correlação entre magnitude energética e conservação revelou que resíduos com contribuição atrativa crítica ao MRK-1 tendem à invariância absoluta (entropia de 0,00 bits), ao passo que resíduos de impacto energético neutro (e.g., ILE1371_RSV/ALA1296_hMPV e ASP1378_RSV/ASN1303_hMPV) admitem substituições neutras. Os pares ASP1380_RSV/ASP1305_hMPV e MET1422_RSV/MET1347_hMPV destacam-se como posições conservadas que exibem contribuições energéticas divergentes entre os dois vírus, enquanto a posição ILE1383_RSV/LEU1308_hMPV, associada a repulsão em ambos os sistemas, apresentou entropia superior, indicando não ser determinante para a catálise basal.

Após a remoção das caudas sintéticas (3xFLAG e 6xHis) e a confirmação da ausência de peptídeos-sinal ou hélices transmembrana, os perfis de pLDDT gerados pelo AlphaFold 3 (AF3) indicaram máxima acurácia preditiva para a proteína L em conformação monomérica (apo), ao passo que a inclusão do tetrâmero de fosfoproteína (L + 4P) reduziu os escores de confiança médios (Figura 9). Foram selecionados o Modelo 2 para L apo e o Modelo 0 para o complexo L + 4P como as predições de maior rigor estereoquímico e métricas de qualidade. A inspeção detalhada das quatro cadeias de fosfoproteína nos modelos preditos de AF3 (designadas B*, C*, D* e E*, equivalentes a B, C, D e E na estrutura experimental PDB 8FPI) evidenciou que a cadeia B (C*) apresentou pLDDT elevado nos resíduos 131–167, correspondentes ao domínio de oligomerização (POD), decaindo na faixa flexível 168–212 e voltando a elevar-se em 213–228, o que converge com a densidade de cryo-EM. Para a cadeia C (B*), o domínio N-terminal (PNTD) exibiu baixa confiança preditiva, restringindo-se os valores elevados aos resíduos 131–185 (POD e segmento inicial do domínio C-terminal, PCTD em contato direto com L), enquanto a região de ligação de M2-1 (M2-1-BR), ausente na cryo-EM experimental, foi predita como uma alfa-hélice contatando os domínios CD, MTase e CTD de L sob baixo pLDDT. Por sua vez, a cadeia D (E*) atingiu pLDDT elevado unicamente no domínio POD (resíduos 131–149), divergindo no domínio PCTD em razão de sua mobilidade e ausência de contatos com L, ao passo que a cadeia E (D*) confinou a alta confiança preditiva aos resíduos 131–142 do POD, permanecendo os segmentos restantes do POD e do PCTD sem densidade resolvida em cryo-EM e adotando conformações distintas nos modelos gerados.

Conclusão

Este estudo aprofundou a compreensão dos mecanismos moleculares e estruturais que regem a inibição alostérica da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp/L) nos pneumovírus VSR e hMPV pelo composto MRK-1. A integração de cálculos quânticos (MFCC-DFT), análise evolutiva de sequências e predições de (co)enovelamento por inteligência artificial permitiu quantificar as energias de interação resíduo a resíduo e estabelecer novas inferências sobre a regulação catalítica e a topologia da enzima.

Os dados demonstraram que a acomodação do MRK-1 no sítio de ligação induz mudanças conformacionais associadas a variações energéticas em pares 100% conservados. Enquanto o pareamento hidrofóbico por interações pi-alquil e pi-pi (e.g.,

VAL1384_VSR, ILE1381_VSR/ILE1306_hMPV e PHE1385_VSR/PHE1310_hMPV) assegura a ancoragem do ligante, as regiões polares respondem pela maior amplitude de variação nas energias de ligação (como observado em LEU1372_VSR/LEU1297_hMPV e ASN1369_VSR/ASN1294_hMPV). Os resíduos de maior afinidade concentram-se adjacentes ao Motivo E do domínio PRNTase, elemento essencial para a organização estrutural do sítio de capeamento e para as transições conformacionais da polimerase. Adicionalmente, posições internas como o resíduo GLU1194_hMPV, situado na alça de capeamento (priming loop), conferem estabilidade termodinâmica e atuam como potenciais reguladores alostéricos por meio da restrição da mobilidade dessa alça.

A análise evolutiva revelou um perfil oscilatório da entropia de Shannon ao longo da polimerase, indicando que a diversidade de sequência preserva mecanismos enzimáticos fundamentais ao mesmo tempo em que viabiliza transições conformacionais mediadas por regiões flexíveis. Evidenciou-se também o papel modulador do tetrâmero da fosfoproteína (P) na arquitetura da RdRp ligada ao molde, bem como a elucidação do Motivo F do domínio RdRp na caracterização de estados propensos à elongação. Em conjunto, os resultados consolidam o MRK-1 como um inibidor alostérico que bloqueia transições conformacionais críticas sem a necessidade de ajuste induzido.

Diante das limitações na avaliação direta de resíduos distantes de L e da ausência de moléculas de água explícitas no modelo, a integração de redes de interação de resíduos (RIRs), simulações de modo normal (BAKAN; MEIRELES; BAHAR, 2011) e predições por IA (JUMPER et al., 2021; ABRAMSON et al., 2024; PASSARO et al., 2025) estabelece bases robustas para futuros fluxos de trabalho com redes por ensemble, complexos contendo M2-1 e ensaios de mutagênese sítio-dirigida, impulsionando o desenho racional de novos fármacos.

Referências

ABRAMSON, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature, v. 630, n. 8016, p. 493–500, jun. 2024.
ALBUQUERQUE, E. et al. DNA-based nanobiostructured devices: The role of quasiperiodicity and correlation effects. Physics Reports, v. 535, n. 4, p. 139–209, fev. 2014.
AMIN, M.; KÜPPER, J. Variations in Proteins Dielectric Constants. ChemistryOpen, v. 9, n. 6, p. 691–694, jun. 2020.
BAKAN, A.; MEIRELES, L. M.; BAHAR, I. ProDy: Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments. Bioinformatics, v. 27, n. 11, p. 1575–1577, jun. 2011.
BARBOSA, E. D. et al. Exploring human porphobilinogen synthase metalloprotein by quantum biochemistry and evolutionary methods. Metallomics, v. 13, n. 4, p. mfab017, abr. 2021.
BARIK, S.; BANERJEE, A. K. Phosphorylation by cellular casein kinase II is essential for transcriptional activity of vesicular stomatitis virus phosphoprotein P. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 89, n. 14, p. 6570–6574, jul. 1992.
BEGUE, S. C. et al. Exploring proteins and protein–ligand complexes through residue interaction networks. Nature Protocols, mar. 2026.
CAO, D. et al. Cryo-EM structure of the respiratory syncytial virus RNA polymerase.

Nature Communications, v. 11, n. 1, p. 368, jan. 2020.
DANTAS, D. S. et al. Quantum molecular modelling of ibuprofen bound to human serum albumin. RSC Advances, v. 5, n. 61, p. 49439–49450, 2015.
DEL CONTE, A. et al. RING 4.0: faster residue interaction networks with novel interaction types across over 35,000 different chemical structures. Nucleic Acids Research, v. 52, n. W1, p. W306–W312, jul. 2024.
DU, Y. et al. Global burden and trends of respiratory syncytial virus infection across different age groups from 1990 to 2019: A systematic analysis of the Global Burden of Disease 2019 Study. International Journal of Infectious Diseases, v. 135, p. 70–76, out. 2023.
FERNANDES, L. L. et al. RevelioPlots: An Interactive Web Application for Fast AI-Based Protein Models Quality Assessment. bioRxiv, 2026.
GRIMME, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. Journal of Computational Chemistry, v. 27, n. 15, p. 1787–1799, nov. 2006.
JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, v. 596, n. 7873, p. 583–589, ago. 2021.
KARIM, M.; LO, C.-W.; EINAV, S. Preparing for the next viral threat with broad-spectrum antivirals. Journal of Clinical Investigation, v. 133, n. 11, jun. 2023.
KATOH, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, jul. 2002.
KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular Biology and Evolution, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.
KLEINER, V. A. et al. Conserved allosteric inhibitory site on the respiratory syncytial virus and human metapneumovirus RNA-dependent RNA polymerases. Communications Biology, v. 6, n. 1, p. 649, jun. 2023.
LIANG, B. Structures of the Mononegavirales Polymerases. Journal of Virology, v. 94, n. 22, out. 2020.
LIANG, Z.; VERKHIVKER, G. M.; HU, G. Integration of network models and evolutionary analysis into high-throughput modeling of protein dynamics and allosteric regulation: theory, tools and applications. Briefings in Bioinformatics, v. 21, n. 3, p. 815–835, maio 2020.
MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. Nucleic Acids Research, v. 52, n. W1, p. W521–W525, jul. 2024.
MASON, S. W. et al. Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) M2-1 and P Proteins Is Required for Reconstitution of M2-1-Dependent RSV Minigenome Activity. Journal of Virology, v. 77, n. 19, p. 10670–10676, out. 2003.
MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. Nucleic Acids Research, v. 49, n. D1, p. D412–D419, jan. 2021.
MOMANY, F. A.; RONE, R. Validation of the general purpose QUANTA ®3.2/CHARMm® force field. Journal of Computational Chemistry, v. 13, n. 7, p. 888–900, set. 1992.
OGINO, T.; GREEN, T. J. RNA Synthesis and Capping by Non-segmented Negative Strand RNA Viral Polymerases: Lessons From a Prototypic Virus. Frontiers in Microbiology, v. 10, jul. 2019.
ORABY, A. K. et al. Structure-Based Discovery of Allosteric Inhibitors Targeting a New Druggable Site in the Respiratory Syncytial Virus Polymerase. ACS Omega, v. 9, n. 20, p. 22213–22229, maio 2024.
OVALLE, S.; MALARDIER-JUGROOT, C. Choice of functional for iron porphyrin

density functional theory studies: Geometry, spin-state, and binding energy analysis. Computational and Theoretical Chemistry, v. 1213, p. 113726, jul. 2022.
PASSARO, S. et al. Boltz-2: Towards Accurate and Efficient Binding Affinity Prediction. bioRxiv, 2025.
RANWEZ, V. et al. MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences Accounting for Frameshifts and Stop Codons. PLoS ONE, v. 6, n. 9, p. e22594, set. 2011.
RENAUD, C.; ENGLUND, J. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infection in Transplant Recipients. In: Transplant Infections. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 581–597.
RODRIGUES, C. et al. Quantum biochemistry study of the T3-785 tropocollagen triple-helical structure. Chemical Physics Letters, v. 559, p. 88–93, fev. 2013.
SAKAMOTO, T.; ORTEGA, J. M. TaxOnTree: a tool that generates trees annotated with taxonomic information. Bioinformatics, 2020.
SAYERS, E. W. et al. GenBank 2025 update. Nucleic Acids Research, v. 53, n. D1, p. D56–D61, jan. 2025.
SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology, v. 7, n. 1, p. MSB201175, out. 2011.
SILVA, G. V. R. et al. Quantum mechanical analysis of newly synthesized HIV-1 protease inhibitors: evaluation of wild-type and resistant strain binding interactions. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 26, n. 42, p. 26748–26764, 2024.
SØNDERGAARD, C. R. et al. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. Journal of Chemical Theory and Computation, v. 7, n. 7, p. 2284–2295, jul. 2011.
TISCHER, C. et al. Respiratory syncytial virus: burden, risks, and the way forward—calling for a collaborative approach at World Prematurity Day 2022. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 323, n. 5, p. L619–L622, nov. 2022.
VELTHUIS, A. J. W. T.; GRIMES, J. M.; FODOR, E. Structural insights into RNA polymerases of negative-sense RNA viruses. Nature Reviews Microbiology, v. 19, n. 5, p. 303–318, maio 2021.
VIANNA, J. F. et al. Binding energies of the drugs capreomycin and streptomycin in complex with tuberculosis bacterial ribosome subunits. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 21, n. 35, p. 19192–19200, 2019.
VICATOS, S.; ROCA, M.; WARSHEL, A. Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, v. 77, n. 3, p. 670–684, nov. 2009.
WANG, X. et al. Global disease burden of and risk factors for acute lower respiratory infections caused by respiratory syncytial virus in preterm infants and young children in 2019: a systematic review and meta-analysis of aggregated and individual participant data. The Lancet, v. 403, n. 10433, p. 1241–1253, mar. 2024.
WANG, X. et al. Electrostatically Embedded Generalized Molecular Fractionation with Conjugate Caps Method for Full Quantum Mechanical Calculation of Protein Energy. The Journal of Physical Chemistry A, v. 117, n. 32, p. 7149–7161, ago. 2013.
ZHANG, D. Quantum mechanical calculation of nanomaterial-ligand interaction energies by molecular fractionation with conjugated caps method. Scientific Reports, v. 7, n. 1, mar. 2017.
ZOU, Y. et al. Common Methods for Phylogenetic Tree Construction and Their Implementation in R. Bioengineering, v. 11, n. 5, p. 480, maio 2024.

Anexos



Figura 1 - O ligante MRK-1 foi particionado em quatro regiões disjuntas, representando os grupos funcionais responsáveis pelas interações com os resíduos de seu sítio de ligação alostérico. A numeração dos átomos foi padronizada conforme apresentado.



Figura 2 - Visão geral das estruturas moleculares (PDB) das polimerases L acopladas a tetrâmero de fosfoproteína (P) complexadas ao MRK-1 para ambos os pneumovírus. A. RSV Ltrunc. B. hMPV L.



Figura 3 - Gráficos de convergência do somatório de energias de interação por raio de ligação para MRK-1 em complexo com A. VSR Ltrunc e B. hMPV L + 4P.



Figura 4 - Painéis gráficos BIRD explicitando resíduos com maior impacto nas energias de interação globais entre MRK-1 e as polimerases A. VSR Ltrunc / B. hMPV L. O átomo específico de MRK-1 mais envolvido na interação e a respectiva região são descritos



Figura 5 - Seleção de aminoácidos críticos de VSR Ltrunc de acordo com painel BIRD para interação com MRK-1 e suas respectivas ligações intermoleculares, por região do MRK-1. A. I, B. II (interações atrativas), C. II (repulsivas), D. III e E. IV.



Figura 6 - Aminoácidos principais (hMPV) quanto à contribuição energética na interação com MRK-1. A figura divide-se pelas regiões de MRK-1: A. I, B. II, C. III e D. IV.



Figura 7 - Árvore filogenética da proteína L de pneumovírus proximamente relacionados. Os clados são coloridos de acordo com o ancestral comum mais recente (LCA) entre cada nó terminal e a sequência base do VSR humano.



Figura 8 - Entropia de Shannon por resíduo na proteína L do VSR em bancos de sequência de larga escala (n = 1349; A) e focado (n = 54; B). Barras verticais indicam valores pontuais e curvas contínuas representam médias móveis (janela de 21 resíduos).



Figura 9 - Distribuição de scores de pLDDT por resíduo (pontos) e intervalos interquartis (boxplots) para modelos estruturais por IA da proteína L do RSV via Boltz-2 (B) e AlphaFold 3 (AF3, M0–M4), avaliados em estado apo (A) / em complexo com o MRK-1 (B)

CÓDIGO: SB1724

AUTOR: ISABELI FRANÇA DE FARIAS

ORIENTADOR: CARLOS ROBERTO SORENSEN DUTRA DA FONSECA

TÍTULO: Asteraceae brasileiras: trade-off entre número e tamanho dos pólens

Resumo

A razão pólen-óvulo é uma característica relacionada à biologia reprodutiva das angiospermas e pode fornecer informações sobre estratégias reprodutivas e sistemas de reprodução vegetal. Este estudo teve como objetivo caracterizar a produção de pólen de espécies de angiospermas a partir da contagem dos grãos de pólen presentes nas amostras analisadas. Para isso, foram coletadas e preparadas amostras de estruturas reprodutivas, sendo realizada a contagem dos grãos de pólen por meio de procedimentos de análise em laboratório. Os resultados permitiram identificar diferenças na quantidade de pólen produzida entre as espécies analisadas, evidenciando variação nessa característica reprodutiva. Dessa forma, o estudo contribui para a compreensão da biologia reprodutiva das espécies avaliadas e para o conhecimento das características relacionadas à reprodução das angiospermas.

Palavras-chave: asterácea; produção de pólen; grãos de pólen; variação interespecífica

TITLE: Asteraceae brasileiras: trade-off entre número e tamanho dos pólens

Abstract

Este estudo teve como objetivo quantificar a produção de grãos de pólen em diferentes espécies da família Asteraceae, buscando avaliar a variação interespecífica no investimento reprodutivo masculino. Foram analisadas amostras de diferentes espécies, nas quais os grãos de pólen foram quantificados para obtenção do número total produzido. Os resultados demonstraram ampla variação na produção de pólen entre as espécies, com valores variando de ausência de grãos em algumas amostras a mais de 6.000 grãos em outras. Centaurea ornata e Centaurea aegyptiaca apresentaram os maiores valores registrados. Os resultados evidenciam diferenças no investimento reprodutivo masculino entre as espécies analisadas e contribuem para estudos comparativos sobre estratégias reprodutivas e variação interespecífica em Asteraceae.

Keywords: Pollen-ovule ratio; Pollen production; Angiosperms;

Introdução

O sucesso reprodutivo das plantas depende de uma série de características relacionadas à produção, dispersão e competição dos grãos de pólen. Embora a quantidade de pólen produzida por uma espécie seja um componente importante do investimento na função masculina, características relacionadas ao tamanho dos grãos também podem desempenhar um papel relevante no processo de fertilização. O tamanho do pólen pode estar associado à quantidade de recursos disponíveis para o desenvolvimento do tubo polínico e, consequentemente, à capacidade de crescimento e competição entre diferentes grãos de pólen provenientes de distintos indivíduos. A relação entre o número e o tamanho dos grãos de pólen é particularmente relevante porque ambas as características podem representar diferentes estratégias de investimento reprodutivo. Enquanto uma maior produção de pólen pode aumentar a probabilidade de que os grãos alcancem o estigma e participem da fertilização, grãos maiores podem apresentar vantagens durante as etapas posteriores da reprodução, especialmente durante o crescimento do tubo polínico e a competição pela fecundação dos óvulos. Dessa forma, é possível que exista uma relação de compensação entre essas características, na qual o aumento do investimento em uma delas esteja associado à redução do investimento na outra. Investigar essa possível relação é importante para compreender como diferentes estratégias reprodutivas podem ter sido moldadas ao longo da evolução das plantas. Além disso, a comparação entre espécies permite avaliar se padrões observados em uma determinada espécie são consistentes em uma escala mais ampla e se características do pólen apresentam associação com a história evolutiva dos grupos estudados. Nesse contexto, as Asteraceae constituem um grupo particularmente relevante para estudos comparativos, devido à sua elevada diversidade e ampla distribuição, possibilitando a investigação da variação interespecífica em características reprodutivas.

Metodologia

Para a realização das análises, foram utilizadas amostras de flores de diferentes espécies de Asteraceae, com o objetivo de quantificar os grãos de pólen produzidos por cada espécie. A preparação das amostras foi realizada de modo a facilitar a liberação e a visualização dos grãos de pólen em microscopia. Inicialmente, as flores selecionadas foram maceradas individualmente em tubos do tipo Eppendorf, buscando promover a liberação dos grãos de pólen presentes nas estruturas florais. Após a maceração, foram adicionados aproximadamente 1.000 micrômetros de ácido lático aos tubos contendo as amostras. A utilização do ácido lático teve como finalidade auxiliar na preparação do material para posterior observação e contagem dos grãos de pólen. Após a adição do ácido lático, as amostras foram submetidas à agitação em agitador do tipo vórtex durante três minutos. Essa etapa teve como objetivo promover uma maior homogeneização do material e favorecer a dispersão dos grãos de pólen na solução, possibilitando uma distribuição mais adequada das partículas para a preparação das lâminas. Em seguida, foram preparadas lâminas microscópicas a partir das suspensões obtidas. As lâminas foram analisadas individualmente em microscópio óptico, permitindo a visualização dos grãos de pólen presentes em cada amostra. Durante a análise, foi realizada a contagem dos grãos de pólen observados em cada lâmina, buscando obter uma estimativa da quantidade de pólen produzida pelas flores analisadas. A contagem foi realizada de forma sistemática, registrando-se os valores obtidos para cada amostra. Os dados provenientes das diferentes lâminas foram posteriormente organizados para permitir a comparação entre as espécies estudadas. Dessa forma, a metodologia possibilitou a obtenção de dados quantitativos referentes à

produção de pólen, que poderão ser utilizados em análises comparativas da variação interespecífica nas características reprodutivas das Asteraceae.

Resultados e Discussões

Resultados e Discussão Os resultados obtidos demonstraram uma ampla variação na produção de grãos de pólen entre as espécies de Asteraceae analisadas. O número total de grãos de pólen apresentou diferenças expressivas entre as espécies, indicando variação interespecífica no investimento reprodutivo masculino. Entre os maiores valores registrados, destacaram-se Centaurea ornata, com 6.815 grãos de pólen, Centaurea aegyptiaca, com 6.671 grãos, e Centaurea virgata, com 3.465 grãos. Também foram observados valores elevados em espécies como Crepis foetida (2.936), Artemisia judaica (2.649), Crepis mollis (2.050) e Crepis jacquin (1.820). Esses resultados demonstram que algumas espécies apresentam elevada produção de pólen, o que pode estar relacionado a diferentes estratégias de reprodução e polinização. Por outro lado, algumas espécies apresentaram valores muito baixos ou ausência de grãos de pólen na amostra analisada. Foram registrados valores iguais a zero para algumas espécies de Hieracium, Crepis e Conyza, enquanto outras apresentaram valores reduzidos, como Achillea sotecea (217), Senecio leucanthemifolius (182) e Artemisia afra (478). Essa diferença evidencia a elevada variação na quantidade de pólen produzida entre as espécies estudadas. De modo geral, os dados indicam que a produção de pólen não é uniforme entre as espécies de Asteraceae, apresentando uma variação de valores próximos a zero até mais de 6.000 grãos por amostra. Essa variação pode estar associada a características específicas de cada espécie, incluindo diferenças na morfologia floral, no sistema reprodutivo e nas estratégias de polinização. Assim, a quantificação dos grãos de pólen contribui para compreender o investimento reprodutivo masculino e possibilita comparações entre diferentes espécies da família Asteraceae. Os resultados obtidos reforçam a importância de estudos comparativos sobre a produção de pólen, uma vez que diferenças na quantidade produzida podem representar diferentes estratégias reprodutivas. A análise conjunta desses dados com outras características, como o tamanho dos grãos de pólen e características florais, poderá auxiliar na identificação de possíveis padrões ecológicos e evolutivos relacionados ao investimento reprodutivo nas espécies avaliadas.

Conclusão

Conclui-se que as espécies de Asteraceae analisadas grande variação na produção de grãos de pólen, evidenciando diferentes níveis de investimento reprodutivo masculino. Essa heterogeneidade sugere a existência de distintas estratégias reprodutivas entre as espécies, possivelmente relacionadas às suas adaptações ecológicas e modos de polinização. Dessa forma, a quantificação do pólen se mostra uma ferramenta importante para a compreensão das dinâmicas reprodutivas e para estudos comparativos dentro do grupo.

Referências

Referências BLOMBERG, S. P.; GARGAN, T. Jr.; IVES, A. R. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. Evolution, Hoboken, v. 57, n. 4, p. 717–745, abr. 2003. CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution, v. 31, p. 32–46, 1977. CRUDEN, R. W. Pollen grain size, stigma depth, and style length: the relationships revisited. Plant Systematics and Evolution, v. 278, p. 223–238, 2009. HO, L. S. T.; ANÉ, C. A linear-time algorithm for Gaussian and non-Gaussian trait evolution models. Systematic Biology, v. 63, p. 397–408, 2014. PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. Bioinformatics, v. 20, p. 289–290, 2004. PATERNO, G.; WERNER, G.; PERONE, C. sensiPhy: sensitivity analysis for comparative methods. Methods in Ecology and Evolution, v. 9, p. 1461–1467, 2018. R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: https://www.r-project.org/. Acesso em: 19 ago. 2026.

CÓDIGO: SB1738

AUTOR: ANDRYELI JENIFFER DOS SANTOS OLIVEIRA

COAUTOR: JOAO VICTOR NICACIO BASILIO

COAUTOR: MATEUS AMARAL DA SILVA

COAUTOR: MARIA VITÓRIA TEIXEIRA PEREIRA

ORIENTADOR: JOAO MARIA GOMES ALENCAR DE SOUZA

TÍTULO: Ocorrência e diversidade de Tephritidae (Diptera) associados a botões florais no Parque Estadual das Dunas do Natal (ZPA 2), Rio Grande do Norte.

Resumo

Os Tephritidae associados às estruturas reprodutivas de Asteraceae são relevantes para o conhecimento da diversidade de insetos fitófagos, embora ainda existam lacunas sobre sua distribuição e plantas hospedeiras no Brasil. Este estudo investigou a ocorrência e a diversidade de Tephritidae associados a capítulos florais no Parque Estadual das Dunas do Natal, Rio Grande do Norte. Os espécimes emergidos foram submetidos à triagem, contagem, sexagem e identificação taxonômica, utilizando diagnoses e caracteres morfológicos descritos na literatura. Foram registrados 27 indivíduos, distribuídos entre *Dictyotrypeta* Hendel, 1914 (21) e *Tomoplagia* Coquillett, 1910 (6), sendo 16 fêmeas e 11 machos. Stilpnopappuscearensis apresentou 26 indivíduos, sendo 20 de *Dictyotrypeta* e seis de *Tomoplagia*, enquanto *Wedelia procumbens* apresentou um indivíduo de *Dictyotrypeta*. A ocorrência simultânea dos dois gêneros em *S. cearensis* amplia o conhecimento sobre as associações entre Tephritidae e Asteraceae no Nordeste brasileiro. Limitações na identificação, especialmente de *Dictyotrypeta*, indicam a necessidade de análises morfológicas, comparação com material de referência e abordagens moleculares. Os resultados contribuem para o conhecimento da fauna de Tephritidae do Parque das Dunas e das relações hospedeiro-inseto na região.

Palavras-chave: Tephritidae;Asteraceae;biodiversidade;insetos endófagos,planta hospeid

TITLE: Occurrence and diversity of Tephritidae associated with flower buds in Dunas State Park of Natal (ZPA 2), Rio Grande do Norte, Brazil.

Abstract

Tephritidae associated with the reproductive structures of Asteraceae are relevant to understanding the diversity of phytophagous insects, although knowledge gaps remain regarding their distribution and host plants in Brazil. This study investigated the occurrence and diversity of Tephritidae associated with flower heads in Parque Estadual das Dunas do Natal, Rio Grande do Norte, northeastern Brazil. Emerged specimens were sorted, counted, sexed, and taxonomically identified using diagnoses and morphological characters available in the literature. A total of 27 individuals were recorded, belonging to *Dictyotrypeta* Hendel, 1914 (21 individuals) and *Tomoplagia* Coquillett, 1910 (6), comprising 16 females and 11 males. Stilpnopappus cearensis hosted 26 individuals, including 20 *Dictyotrypeta* and six *Tomoplagia*, whereas *Wedelia procumbens* hosted one *Dictyotrypeta* individual. The simultaneous occurrence of both genera in *S. cearensis* expands current knowledge of Tephritidae–Asteraceae associations in northeastern Brazil. Taxonomic limitations, particularly concerning *Dictyotrypeta*, highlight the need for detailed morphological analyses, comparisons with reference material, and molecular approaches. These findings contribute to the knowledge of the Tephritidae fauna of Parque das Dunas and provide new insights into host–insect relationships in the region.

Keywords: Tephritidae; Asteraceae; biodiversity; endophagous insects; host plant

Introdução

Os insetos constituem o grupo com o maior número de espécies já descritas, com aproximadamente um milhão de espécies registradas até o momento (STORK, 2018). Entre eles, a família Tephritidae destaca-se por sua radiação adaptativa e elevada diversidade morfológica e comportamental, a atenção científica sobre esse grupo concentrou-se nas chamadas moscas-das-frutas (como espécies dos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis*), devido aos severos prejuízos que suas larvas frugívoras causam à fruticultura mundial (DEUS; ADAIME, 2013). Em contrapartida, as linhagens não frugívoras e as moscas associadas a botões florais e inflorescências agem como agentes de biocontrole para suprimir espécies invasoras (WINSTON et al., 2017), tornando-se bioindicadoras cruciais para a integridade e resiliência de áreas fragmentadas e preservadas, apesar disso permanecem expressivamente negligenciadas na literatura entomológica, evidenciando uma lacuna de conhecimento gerada pelo direcionamento agronômico das pesquisas para as espécies frugívoras de alto valor econômico.

Nesse contexto, diferentes gêneros de Tephritidae apresentam associações com estruturas reprodutivas em plantas da família Asteraceae, a subfamília Tephritinae, de hábitos florívoros, utiliza os capítulos florais como recursos para a oviposição e o desenvolvimento de suas formas imaturas, a diversidade dessas associações pode variar de acordo com a composição da flora e a disponibilidade de hospedeiros (DINIZ; PRADO; LEWINSOHN, 2010). A investigação dessas relações pode contribuir para a identificação de padrões de especificidade entre Tephritinae e suas plantas hospedeiras e para o conhecimento da distribuição desses grupos em diferentes regiões, considerando que os tefritídeos não frugívoros desempenham papéis ecológicos vitais na dinâmica de ecossistemas naturais.

Investigar essas interações ecológicas em fragmentos urbanos protegidos é fundamental para a compreensão da diversidade, no contexto potiguar, o Parque Estadual das Dunas

Jornalista Luiz Maria Alves destaca-se sendo a primeira Unidade de Conservação do Rio Grande do Norte e o principal ecossistema dunar protegido combinado entre remanescentes do bioma Mata Atlântica e ao ecossistema de restinga. Sua composição abriga uma flora nativa e espécies de Asteraceae adaptadas às condições litorâneas, à salinidade e ao estresse hídrico costeiro. Essas características tornam o parque uma área estratégica para pesquisas direcionadas da diversidade de moscas florívoras, para a compreensão de como as interações inseto-plantas se estruturam e constituindo uma base indispensável para a integridade ecológica do ambiente.

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência e a diversidade de Tephritidae e associados a botões florais no Parque Estadual das Dunas do Natal Jornalista Luiz Maria Alves, buscando caracterizar os espécimes obtidos, quantificar sua ocorrência e realizar a sexagem morfológica dos indivíduos. Além disso, o estudo busca contribuir para o conhecimento das interações entre Tephritoidea e plantas hospedeiras em ambiente natural e ampliar os registros sobre a fauna de tefritídeos no Nordeste brasileiro.

Metodologia

ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado nas trilhas do Parque Estadual Dunas do Natal Jornalista Luiz Maria Alves, localizado no município de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. A área constitui uma unidade de conservação estadual inserida em ambiente urbano, apresentando vegetação característica de sistemas dunares e remanescentes de Mata Atlântica, constituindo ambiente representativo para o estudo da associação entre insetos fitófagos e suas plantas hospedeiras.

AMOSTRAGEM E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Foram realizadas coletas de capítulos florais de plantas hospedeiras presentes na área de estudo, durante as atividades de campo, os capítulos florais foram acondicionados individualmente em sacolas plásticas devidamente identificadas, contendo informações referentes à localidade, data da coleta e planta hospedeira. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para as instalações destinadas ao processamento e acompanhamento.

TRIAGEM E OBTENÇÃO DOS TEPHRITIDAE

Após a chegada das amostras, os capítulos florais foram encaminhados à sala de triagem e pesagem, onde foram submetidos à determinação de sua massa. Quando necessário, a pesagem foi realizada em porções sucessivas, de acordo com a capacidade da balança utilizada. Posteriormente, os capítulos florais foram transferidos para recipientes destinados à incubação das amostras, para cada amostra, foi preparada uma camada de vermiculita previamente hidratada, com umidade suficiente para manter condições adequadas ao desenvolvimento dos organismos associados ao material vegetal. Os

capítulos florais foram dispostos sobre a vermiculita e acondicionados em gaiolas de acrílico, permitindo o acompanhamento da emergência dos insetos.

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Cada unidade amostral foi identificada com informações referentes à localidade, data de coleta e planta hospedeira, permitindo a rastreabilidade das amostras durante todo o período de acompanhamento. As amostras foram mantidas em condições controladas de armazenamento e monitoradas periodicamente para o registro da emergência dos insetos associados aos capítulos florais.Os insetos adultos emergidos durante o período de incubação foram coletados das gaiolas de acrílico e submetidos à eutanásia por congelamento. Posteriormente, os espécimes foram preservados em álcool etílico a 70%, permanecendo armazenados até a realização dos procedimentos de triagem, contagem e identificação taxonômica.Os espécimes preservados foram retirados dos recipientes de armazenamento com auxílio de pinça, buscando minimizar danos às estruturas morfológicas, os exemplares foram transferidos individualmente para placas de Petri ou placas entomológicas e analisados sob estereomicroscópio.

A contagem foi realizada considerando todos os indivíduos emergidos de cada amostra. Posteriormente, foi realizada a sexagem morfológica dos espécimes, com auxílio do estereomicroscópio, a determinação do sexo foi baseada principalmente nas características morfológicas da extremidade abdominal, especialmente na presença ou ausência do ovipositor. Os indivíduos que apresentaram ovipositor foram classificados como fêmeas, enquanto aqueles que não apresentaram essa estrutura foram classificados como machos. Ao final do procedimento, foram registrados, para cada planta hospedeira, o número total de espécimes emergidos e a quantidade de machos e fêmeas.

A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada com base nas características morfológicas observadas nos exemplares, em razão da ausência de chaves taxonômicas específicas disponíveis para a identificação dos grupos analisados, foram utilizadas como referências as diagnoses e as características morfológicas apresentadas nas descrições originais dos táxons, incluindo aquelas referentes aos gêneros *Dictyotrypeta* Hendel, 1914 e *Tomoplagia* Coquillett, 1910. As características descritas nas obras originais foram comparadas com os caracteres morfológicos observados nos espécimes analisados, considerando aspectos relevantes para a identificação taxonômica dos grupos. Quando possível, os espécimes foram identificados até o nível de gênero e espécie, nos casos em que não foi possível determinar a espécie com segurança, a identificação foi mantida no nível taxonômico mais abrangente permitido pelas características morfológicas observadas.

ORGANIZAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram organizados em planilha, considerando as informações referentes à planta hospedeira, data e localidade de coleta, massa do material vegetal coletado, número total de espécimes emergidos e quantidade de machos e fêmeas. A partir dos dados obtidos, foram calculadas as frequências de ocorrência dos táxons registrados e a proporção de machos e fêmeas entre os indivíduos emergidos de cada planta hospedeira. Os espécimes identificados foram organizados segundo gênero e espécie, possibilitando a caracterização da diversidade de Tephritidae associada às plantas hospedeiras amostradas no Parque Estadual Dunas do Natal Jornalista Luiz Maria Alves.

Resultados e Discussões

Foram registrados 27 indivíduos de Tephritidae associados aos capítulos florais das plantas hospedeiras amostradas no Parque Estadual das Dunas do Natal Jornalista Luiz Maria Alves. Os espécimes foram distribuídos entre os gêneros *Dictyotrypeta* Hendel, 1914 e *Tomoplagia* Coquillett, 1910, sendo 16 fêmeas e 11 machos.

Dictyotrypeta apresentou maior abundância, com 21 indivíduos, correspondentes a 77,8% dos espécimes associados às plantas hospedeiras. Desse total, 13 eram fêmeas e oito machos. Os indivíduos foram registrados principalmente em *Stilpnopappus cearensis*, que concentrou 20 espécimes, além de um indivíduo associado a *Wedelia procumbens* (Baker). *Tomoplagia* foi representado por seis indivíduos, correspondentes a 22,2% dos espécimes associados aos capítulos florais, sendo três fêmeas e três machos, todos os indivíduos desse gênero foram registrados em *S. cearensis*.

Entre as plantas hospedeiras, *S. cearensis* apresentou a maior quantidade de Tephritidae, com 26 indivíduos, correspondentes a 96,3% do total de espécimes associados às plantas. Desses, 20 pertenciam a Dictyotrypeta e seis a *Tomoplagia*, a espécie *W. procumbens* apresentou um indivíduo de *Dictyotrypeta*. A distribuição dos indivíduos de *Dictyotrypeta* entre as amostras de S. cearensis variou quanto ao número de exemplares e à composição sexual, foram registradas amostras contendo indivíduos de ambos os sexos, além de amostras constituídas exclusivamente por machos ou por fêmeas.

Quanto à proporção sexual, entre os 27 indivíduos associados às plantas hospedeiras, foram registradas 16 fêmeas (59,3%) e 11 machos (40,7%). Em *Dictyotrypeta*, foram observadas 13 fêmeas e oito machos, enquanto Tomoplagia apresentou 3 três fêmeas e 3 três machos, de acordo com a tabela 1 abaixo.

A ocorrência de *Dictyotrypeta* e *Tomoplagia* associadas aos capítulos florais de *Stilpnopappus cearensis* constitui o principal resultado deste levantamento, especialmente por se tratar de uma associação registrada em uma unidade de conservação localizada no Nordeste brasileiro. Dos 27 indivíduos de Tephritidae obtidos diretamente de plantas hospedeiras, 26 foram registrados em S. cearensis, sendo 20 pertencentes a *Dictyotrypeta* e seis a *Tomoplagia*. A elevada concentração dos espécimes nessa espécie vegetal evidencia a importância de *S. cearensis* no conjunto de associações observadas. Entretanto, o número e a distribuição das amostras não permitem, isoladamente, estabelecer preferência ou especificidade dos tefritídeos pelo hospedeiro.

A associação entre Tephritidae e Asteraceae é amplamente documentada, especialmente entre espécies que utilizam estruturas florais como recurso para oviposição e desenvolvimento larval. Prado et al. (2002) demonstraram a diversidade de Tephritidae associados a capítulos de Asteraceae no Brasil, evidenciando a importância desse grupo de plantas para a ocorrência e distribuição dos tefritídeos. Da mesma forma, Sabedot-Bordin et al. (2011) registraram tefritídeos endófagos associados a Asteraceae em Santa Catarina, enquanto Savaris et al. (2015) ampliaram os registros de hospedeiros e distribuição de Tephritidae associados a essa família vegetal no Rio Grande do Sul. Esses estudos demonstram que levantamentos direcionados às estruturas reprodutivas de

Asteraceae podem contribuir significativamente para o conhecimento das associações entre plantas hospedeiras e Tephritidae.

Nesse contexto, a ocorrência de 20 indivíduos de *Dictyotrypeta* em *Stilpnopappus cearensis* representa um resultado de interesse, uma vez que amplia as informações disponíveis sobre a ocorrência do gênero associado a plantas da família Asteraceae no Nordeste brasileiro. Entretanto, o ineditismo dessa associação não deve ser afirmado de forma definitiva apenas com base nos dados obtidos. É necessária uma revisão bibliográfica e taxonômica específica, abrangendo registros publicados, coleções científicas e bases de dados especializadas, para verificar se *S. cearensis* já foi anteriormente registrada como hospedeira de *Dictyotrypeta*.

A ocorrência de *Tomoplagia* em *Stilpnopappus cearensis* também reforça a importância das Asteraceae como recursos para Tephritidae não frugívoros. Estudos anteriores demonstram associações entre espécies de Tephritidae e diferentes espécies de Asteraceae, evidenciando a importância dessa família vegetal para espécies que utilizam os capítulos durante o desenvolvimento larval (Prado et al., 2002; Sabedot-Bordin et al., 2011; Savaris et al., 2015). Dessa forma, os seis indivíduos de Tomoplagia obtidos em *S. cearensis* contribuem para ampliar o conhecimento sobre a ocorrência do gênero associado a plantas hospedeiras no Nordeste brasileiro.

A presença simultânea de *Dictyotrypeta* e *Tomoplagia* em *S. cearensis* também abre uma questão ecológica relevante. Embora os dois gêneros tenham sido obtidos a partir da mesma espécie vegetal, os dados não permitem afirmar que utilizem exatamente os mesmos tecidos ou estruturas dos capítulos, tampouco que exista competição entre eles. É possível que diferenças no local de oviposição, no desenvolvimento larval ou no período de utilização do recurso contribuam para a coexistência desses táxons. Estudos futuros que acompanhem individualmente os capítulos desde a coleta até a emergência dos adultos poderão esclarecer essas relações.

Um aspecto particularmente relevante é que *Dictyotrypeta* também foi registrada em *Wedelia procumbens*, embora com apenas um indivíduo. Esse registro demonstra que o gênero não esteve restrito a uma única espécie vegetal no conjunto analisado. Entretanto, devido ao baixo número de indivíduos obtidos nesse hospedeiro, não é possível avaliar a existência de preferência ou especificidade. A ocorrência de *Dictyotrypeta* em mais de uma espécie de Asteraceae reforça a necessidade de ampliar o esforço amostral para determinar a amplitude de plantas utilizadas pelo gênero na região.

A predominância de *Dictyotrypeta* entre os indivíduos associados às plantas hospedeiras deve, contudo, ser interpretada com cautela. A maior abundância do gênero pode estar relacionada à quantidade de capítulos coletados, ao estado fenológico das plantas, à disponibilidade do recurso, às características dos capítulos ou ao período em que as amostras foram obtidas. Como o esforço amostral não foi uniformemente distribuído entre todas as plantas hospedeiras, a comparação das abundâncias absolutas não permite inferir diferenças de preferência entre os hospedeiros.

A identificação taxonômica constitui outra limitação importante do estudo. Conforme observado durante a análise dos exemplares, a ausência de chaves taxonômicas específicas dificultou principalmente a identificação de *Dictyotrypeta*. Por essa razão, foram utilizadas as diagnoses e características morfológicas presentes nas descrições

originais dos táxons, incluindo Hendel (1914) para *Dictyotrypeta* e as descrições correspondentes para *Tomoplagia*. Essa abordagem permitiu a identificação dos exemplares dentro dos limites impostos pela literatura disponível, mas não substitui uma análise taxonômica comparativa mais abrangente.

No caso de *Dictyotrypeta*, essa limitação é especialmente importante porque alguns exemplares apresentaram características que justificam uma investigação taxonômica mais detalhada. Entretanto, os dados obtidos não são suficientes para afirmar a existência de uma espécie nova. A avaliação dessa hipótese exige comparação detalhada com espécies previamente descritas, análise de material de referência ou material-tipo, quando disponível, e avaliação de uma série maior de exemplares. Dados moleculares também podem ser utilizados como ferramenta complementar para a delimitação de espécies morfologicamente semelhantes.

O esforço amostral constitui outra limitação metodológica. A concentração de 26 dos 27 indivíduos associados às plantas em *Stilpnopappus cearensis* pode refletir tanto uma relação biológica com esse hospedeiro quanto a disponibilidade e o número de estruturas coletadas. Para diferenciar essas possibilidades, estudos futuros devem padronizar o número de plantas, a quantidade de capítulos, a massa de material vegetal e os períodos de coleta para cada espécie hospedeira.

A realização de amostragens em diferentes épocas do ano também é necessária, uma vez que a disponibilidade de capítulos florais e a ocorrência dos Tephritidae podem variar sazonalmente. Além disso, o acompanhamento individualizado dos capítulos desde a coleta até a emergência dos adultos permitiria estabelecer com maior segurança a relação entre cada espécie de tefritídeo e sua planta hospedeira, além de possibilitar o cálculo de taxas de infestação e emergência.

Dessa maneira, o estudo preenche uma lacuna relacionada ao conhecimento de Tephritidae associados a plantas hospedeiras em uma unidade de conservação do Nordeste brasileiro, especialmente pela documentação da ocorrência de *Dictyotrypeta* e *Tomoplagia* em *Stilpnopappus cearensis*. Ao mesmo tempo, os resultados abrem novas questões sobre a amplitude de hospedeiros de *Dictyotrypeta*, a possível novidade da associação com *S. cearensis*, os mecanismos que permitem a ocorrência simultânea dos dois gêneros e a delimitação taxonômica dos exemplares analisados.

Conclusão

O presente estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre a ocorrência de Tephritidae associados a capítulos florais no Parque Estadual das Dunas do Natal Jornalista Luiz Maria Alves, registrando representantes dos gêneros *Dictyotrypeta* e *Tomoplagia*. Foram obtidos 27 indivíduos diretamente associados às plantas hospedeiras, dos quais 21 pertenciam a *Dictyotrypeta* e seis a *Tomoplagia*.

A principal associação observada ocorreu com *Stilpnopappus cearensis*, que concentrou 26 dos 27 indivíduos obtidos a partir das plantas hospedeiras, a ocorrência simultânea de *Dictyotrypeta* e *Tomoplagia* nessa espécie vegetal constitui um resultado de interesse para o conhecimento das relações entre Tephritidae e Asteraceae no Nordeste brasileiro. *Dictyotrypeta* também foi registrado em *Wedelia procumbens*, ampliando o conjunto de plantas hospedeiras observadas para o gênero no levantamento.

A associação entre *Dictyotrypeta* e Stilpnopappus cearensis merece investigação adicional, uma vez que não é possível, com os dados disponíveis, afirmar definitivamente seu ineditismo como associação hospedeira, da mesma forma, os caracteres morfológicos observados em alguns exemplares justificam estudos taxonômicos complementares, mas não permitem afirmar a existência de uma espécie nova. As principais limitações do estudo estavam relacionadas à ausência de chaves taxonômicas específicas, ao baixo número de indivíduos obtidos para alguns táxons e à distribuição desigual do esforço amostral entre as plantas hospedeiras. Essas limitações reforçam a necessidade de novos levantamentos, com maior número de amostras, padronização do esforço de coleta, acompanhamento individualizado dos capítulos até a emergência dos adultos e realização de amostragens em diferentes períodos do ano.

Portanto, o levantamento fornece informações relevantes sobre a fauna de Tephritidae associada à vegetação do Parque das Dunas e evidencia novas oportunidades de pesquisa relacionadas à taxonomia de *Dictyotrypeta*, à confirmação das associações hospedeiras, à amplitude de utilização de Asteraceae e à possível coexistência ecológica entre *Dictyotrypeta* e *Tomoplagia* em *Stilpnopappus cearensis*.

Referências

DINIZ, S.; PRADO, P. I.; LEWINSOHN, T. M. Species richness in natural and disturbed habitats: Asteraceae and flower-head insects (Tephritidae: Diptera). Neotropical Entomology, v. 39, n. 2, p. 163–171, 2010. DOI: 10.1590/S1519-566X2010000200004.

DEUS, E. G.; ADAIME, R. Dez anos de pesquisas sobre moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no estado do Amapá: avanços obtidos e desafios futuros. Biota Amazônia, Macapá, v. 3, n. 3, p. 157–168, 2013.

HENDEL, F. G. Die Bohrfliegen Südamerikas. Übersicht und Katalog der bisher aus der neotropischen Region beschriebenen Tephritinen. Abhandlungen und Berichte des Königlichen Zoologischen und Anthropologisch-Ethnographischen Museums zu Dresden, v. 14, n. 3, p. 1–84, 1914.

TURNER, B. L. New names and combinations in Wedelia (Asteraceae-Heliantheae). Phytologia, v. 72, n. 3, p. 169-171, 1992.

HUBER, J. Stilpnopappus cearensis. Bulletin de l'Herbier Boissier, sér. 2, v. 1, p. 327, 1901.

SABEDOT-BORDIN, S. M. et al. Tefritídeos endófagos (Diptera: Tephritidae) associados à Asteraceae em Chapecó, Santa Catarina. Biotemas, v. 24, n. 1, p. 15–20, 2011. DOI: 10.5007/2175-7925.2011v24n1p15.

SAVARIS, M. et al. Interaction between Tephritidae (Insecta, Diptera) and plants of the family Asteraceae: new host and distribution records for the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia, 2015.

STORK, N. E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? Annual Review of Entomology, v. 63, p. 31–45, 2018.

WINSTON, R. L. et al. Biology and biological control of knapweeds and star-thistles. [S. l.]: USDA Forest Service, Forest Health Assessment and Applied Sciences Team (FHAST), 2017. (FHAST-2016-06).

PRADO, P. I. et al. A fauna de Tephritidae (Diptera) dos capítulos de Asteraceae no Brasil. [researchgate], v. 104, p. 1007–1028, 2002.

Anexos



Tabela 1 – Distribuição dos indivíduos de Tephritidae por gênero, planta hospedeira e sexo .

CÓDIGO: SB1748

AUTOR: JÚLIA DANTAS VIEIRA

ORIENTADOR: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA

TÍTULO: Produção e estudo da atividade antimicrobiana de um nanogel de Quitosana contendo um peptídeo análogo da Stigmurina presente na peçonha do escorpião Tityus stigmurus.

Resumo

O estudo avaliou a atividade antibacteriana do peptídeo análogo StigA16 (derivado da Stigmurina de Tityus stigmurus) veiculado em nanopartículas de quitosana (NPQ) e incorporado em nanogel de Pluronic F-127. As NPQs foram obtidas por gelificação iônica via métodos de incorporação (INC 2,5% e 5%) e adsorção (ADS 2,5% e 5%). As dispersões coloidais apresentaram tamanho nanométrico (97,15 a 133,2 nm), potencial Zeta positivo (+18,7 a +23,4 mV) e PDI moderado (0,376 a 0,623). As formulações demonstraram maior eficácia inibitória contra Staphylococcus aureus (CIM de 44,625 a 89,25 µg/mL) do que frente a Pseudomonas aeruginosa (CIM de 178,5 a 357 µg/mL), com destaque para as amostras por incorporação. No ensaio de difusão em ágar, os nanogéis formaram halos de inibição proeminentes contra S. aureus, confirmando a capacidade de liberação do ativo para potencial aplicação tópica.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, nanossistemas, atividade antibacteriana

TITLE: Production and evaluation of the antimicrobial activity of a chitosan nanogel containing an analog peptide of Stigmurin found in Tityus stigmurus scorpion venom.

Abstract

This study evaluated the antibacterial activity of the analog peptide StigA16 (derived from Stigmurin found in Tityus stigmurus scorpion venom) delivered via chitosan nanoparticles (CNPs) and incorporated into a Pluronic F-127 nanogel. CNPs were synthesized by ionic gelation using incorporation (INC 2.5% and 5%) and adsorption (ADS 2.5% and 5%) methods. The colloidal dispersions exhibited nanoscale

dimensions (97.15 to 133.2 nm), positive Zeta potential (+18.7 to +23.4 mV), and a moderate polydispersity index (0.376 to 0.623). The formulations demonstrated superior inhibitory efficacy against Staphylococcus aureus (MIC ranging from 44.625 to 89.25 µg/mL) compared to Pseudomonas aeruginosa (MIC ranging from 178.5 to 357 µg/mL), with incorporation-based formulations showing the highest potency. In the agar diffusion assay, the nanogels produced prominent inhibition zones against S. aureus, confirming the release capability of the active compound for potential topical application.

Keywords: Antimicrobial peptides, nanosystems, antibacterial activity.

Introdução

A capacidade de reparo e regeneração tecidual representa um mecanismo biológico fundamental para a preservação da homeostase e da sobrevivência dos organismos frente a agressões ambientais. Falhas ou lentidão nesse processo podem comprometer criticamente a integridade funcional do tecido lesionado, favorecendo contaminações e infecções oportunistas. Com o intuito de otimizar o processo de cicatrização e superar limitações terapêuticas como a resistência bacteriana crescente aos antibióticos convencionais, pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento de novos biomateriais associados à peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Os AMPs são moléculas heterogêneas e catiônicas produzidas por diversos organismos como parte da resposta imune inata. Entre essas moléculas, destaca-se a Stigmurina, um peptídeo derivado da peçonha do escorpião Tityus stigmurus, o qual apresenta propriedades antimicrobianas, antiproliferativas e antioxidantes in vitro em concentrações não hemolíticas. O seu análogo sintético, denominado StigA16 (FFKLIPKLVKGLISAFK-NH2), exibe um potencial antibacteriano superior devido à uma presença maior de resíduos de aminoácidos catiônicos e formação de estrutura helicoidal, que favorecem a interação e inserção à membranas celulares como é o caso das bactérias (PARENTE et al., 2018).

Contudo, a aplicação clínica de peptídeos livres encontra entraves como a rápida degradação enzimática e baixa estabilidade no local da lesão. Para contornar essas limitações, a veiculação do StigA16 em matrizes nanoestruturadas de quitosana desponta como uma alternativa tecnológica vantajosa. A quitosana é um polímero natural derivado da desacetilação da quitina, amplamente reconhecido por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e propriedades mucoadesivas e intrinsecamente bactericidas. A estruturação dessas nanopartículas em um nanogel — empregando copolímeros não iônicos como o Pluronic F-127 — permite a obtenção de uma formulação farmacêutica de liberação sustentada e ideal para aplicação tópica em feridas.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo produzir, caracterizar do ponto de vista físico-químico e avaliar a atividade antimicrobiana de nanogéis de quitosana contendo o peptídeo análogo StigA16 frente a cepas de Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa, visando sua futura aplicação como agente terapêutico e regenerativo.

OBJETIVO GERAL:

Desenvolver e avaliar um nanogel à base de quitosana contendo um peptídeo análogo da Stigmurina, derivado da peçonha do escorpião T. stigmurus, visando investigar suas propriedades físico-químicas e sua atividade antimicrobiana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar nanopartículas de quitosana (NPQ) pelo método de gelificação iônica.

Obter nanossistemas vazios e contendo o peptídeo StigA16 obtidos pelos métodos de incorporação e adsorção nas proporções de 2,5% e 5% em relação à massa de quitosana.

Caracterizar as nanopartículas quanto às suas propriedades organolépticas e físico-químicas, determinando o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta.

Obter nanogéis a partir das soluções de nanopartículas associadas ou não ao StigA16.

Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas associadas ou não a StigA16 pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Avaliar a atividade antimicrobiana dos nanogéis associados ou não ao peptídeo pelo método de difusão em ágar.

Metodologia

PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA: As nanopartículas de quitosana (NPQ) para a incorporação da peçonha foram obtidas através da metodologia da gelificação iônica. Para o experimento, foram preparadas soluções de quitosana 0,1% (m/v) em solução de ácido acético 0,175% (v/v) (pH = 4,0) com volume final de 5 mL. Além disso, foi preparada uma solução de tripolifosfato polianiônico (TPP) 0,1% em água destilada (pH = 9,0) com volume final de 2 mL (m/v). A solução de TPP foi vertida na solução de quitosana, por gotejamento, sob agitação constante de 300 rpm e a temperatura de 25 °C, por 30 minutos. Ao final pôde se observar a formação de uma dispersão opalescente em um volume total de 7 mL (Gan; Wang, 2007; Rocha Soares et al., 2018). Uma solução de 1mg/ml do peptídeo análogo (StigA16) em água ultrapura foi preparada previamente para o desenvolvimento das NPQs pelos métodos de incorporação (INC) e adsorção (ADS). Para o método de incorporação, alíquotas de StigA16 foram solubilizadas previamente à solução de TPP antes da adição à quitosana, nas proporções finais em relação a massa de quitosana de 5% (INC 5%) e 2,5% (INC 2,5%). Quanto ao método de adsorção, o peptídeo foi adicionado ao sistema após o processo de gotejamento do TPP à dispersão de quitosana nas mesmas proporções anteriormente citadas de 5% (ADS 5%) e 2,5% (ADS 2,5%). O sistema prosseguiu sob agitação constante sob as mesmas condições previamente descritas por 60 minutos adicionais. Os nanossistemas produzidos foram armazenados em recipientes estéreis a 8°C.

PRODUÇÃO DO NANOGEL: O nanogel foi produzido no método a frio (PHUC LE et al., 2013), onde 2 mL de cada nanosistema produzido por incorporação (INC 5% e INC 2,5%) e adsorção (ADS 5% e ADS 2,5%), assim como as nanopartículas vazias (NPQ) foram submetidos a agitação vigorosa em um banho de gelo enquanto o co-polímero não iônico Pluronic F-127 foi adicionado na proporção de 25% p/v. A agitação permaneceu constante por 40 minutos à 8°C. Após a produção, os nanogéis obtidos a partir de nanopartículas incorporadas (NG-INC 5% e NG-INC 2,5%), adsorvidas (NG-ADS 5% e NG-ADS 2,5%) e vazias (NG-NPQ) foram armazenados em recipientes estéreis a 8°C.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS: O Potencial Zeta (PZ) das nanopartículas INC 5%, INC 2,5%, ADS 5% e ADS 2,5% foi determinado por espalhamento de luz eletroforético (ZetaSizer NanoZS, Malvern, Reino Unido), aplicando-se uma intensidade de campo de aproximadamente 5,9 $V \cdot cm^{-1}$. O tamanho das partículas e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foram determinados pelo método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com base na intensidade, utilizando um analisador de tamanho de partículas a 659 nm, com ângulo de detecção de 173° e temperatura de 25 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os dados foram expressos como média ± desvio-padrão (Rocha Soares et al., 2018). Além disso, características como cor, odor e aspecto dos nanogéis NG-NPQ, NG-INC 5%, NG-INC 2,5%, NG-ADS 5% e NG-ADS 2,5% foram aferidos macroscopicamente.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM): A padronização do inóculo dos microrganismos Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027) foi executada seguindo a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2026). Para avaliação da atividade antibacteriana os microrganismos foram cultivados em meio BHI durante 24 horas e posteriormente, uma suspensão microbiana a 1x108 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland) foi obtida em solução salina estéril 0,9% e diluída na proporção de 1:100 (v/v) em caldo Muller Hinton (MH), correspondente a 1x106 UFC/mL. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das cepas foram determinadas de acordo com a metodologia também descrita pelo CLSI (2026), com modificações. Em placa de 96 poços, 50 µL das amostras (NPQ, INC 5%, INC 2,5%, ADS 5% e ADS 2,5%) previamente diluídas (1/1; 1/2; 1/4; 1/8) em MH, foram adicionados à 50 µL da suspensão de microrganismos a 1x106 UFC/mL. A suspensão foi incubada a 35±2ºC por 24 h, sob agitação a 200 rpm, sendo avaliada a densidade óptica a 595 nm em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, Estados Unidos da América). Os poços contendo MH foram utilizados como controle de esterilidade do meio (controle negativo). Poços apenas com a suspensão de microrganismo foram utilizados como controle positivo. A CIM foi determinada como a mínima concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano (em que a absorbância a 595 nm foi a mesma do controle negativo de crescimento). Cada amostra foi testada em triplicata e cada experimento foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram expressos em µg/mL de peptídeo livre e µg/mL de quitosana.

ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR MH: A atividade antibacteriana dos nanogéis foi avaliada pelo método de difusão em ágar, conforme metodologia descrita por Aayush et al. (2025), frente a S. aureus (ATCC 25923). O inóculo bacteriano foi padronizado em solução salina estéril a 0,9%, correspondente a 1×10^8 UFC/mL, conforme a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos sobre a superfície das placas de Petri estéreis contendo ágar MH, realizando-se a semeadura em superfície com auxílio de swab estéril, de modo a obter uma distribuição uniforme do inóculo bacteriano. Posteriormente, foram aplicados 70 µL de cada formulação (NG-

NPQ, NG-INC 5%, NG-INC 2,5% e NG-ADS 5%) em áreas previamente delimitadas da superfície do ágar, mantendo-se distância adequada entre os pontos de aplicação para evitar a sobreposição dos halos de inibição. A vancomicina, na concentração de 250 µg/mL, foi utilizada como controle positivo da atividade antibacteriana, sendo previamente ressuspendida em água ultrapura. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após o período de incubação, a atividade antibacteriana foi determinada pela observação dos halos de inibição bacteriana ao redor dos pontos de aplicação.

Resultados e Discussões

Produção e características físico-químicas e organolépticas das NPQ

A evidência da administração de fármacos através de nanossistemas de quitosana demonstra-se consistentemente relevante conforme novos ativos e suas atividades vêm sendo pesquisadas continuamente. Juntamente com sua habilidade de estabilizar, distribuir e otimizar a ação dos ativos submetidos à técnica, soluções de nanopartículas oferecem uma gama de novas e eficientes formas de administração dos fármacos que normalmente não seriam possíveis devido às suas naturezas físico-químicas intrínsecas. O uso da quitosana para confecção dos sistemas ainda oferece a biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo que o material derivado da quitina oferece, além de sua hidrofobicidade e caráter catiônico poderem ainda permitir sua ampla distribuição pelas membranas corporais e suplementar a ação do fármaco, respectivamente (JHA et al., 2023).

As nanopartículas produzidas nas diferentes concentrações e condições metodológicas apresentaram características compatíveis com a formação de sistemas coloidais, conforme evidenciado pela observação do efeito Tyndall após a incidência de um feixe de laser sobre as dispersões (Figura 1). Esse fenômeno decorre da dispersão da radiação eletromagnética pelas partículas presentes na fase dispersa, permitindo a visualização do trajeto do feixe luminoso no interior da suspensão (YUAN et al., 2022). Embora as partículas coloidais não sejam individualmente discerníveis a olho nu, sua presença pode ser evidenciada pela interação com a luz, uma vez que suas dimensões se encontram na escala nanométrica a submicrométrica, possibilitando a dispersão da radiação incidente. Dessa forma, a observação do efeito Tyndall constitui uma evidência qualitativa da formação e manutenção de uma dispersão coloidal, sendo posteriormente complementada pela caracterização físico-química do nanosistema, como determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta.

As nanopartículas apresentaram características organolépticas consistentes independentemente da técnica ou concentração utilizadas, apresentando aspecto incolor, homogêneo e levemente translúcido, textura líquida e odor leve. É válido ressaltar que a análise foi feita de forma macroscópica e preliminar, sendo necessárias futuras análises físico-químicas como medição de pH e eficiência de incorporação para melhor caracterização das formulações.

A formação da nanopartícula de quitosana em si se deu pela interação dos grupos aniônicos presentes no TPP com os grupamentos amina catiônicos da quitosana, e a adição tanto de forma incorporada quanto adsorvida do StigA16 se tornou possível

devido à interação dos seus componentes aniônicos e a carga catiônica do grupamento amina da quitosana. A possível competição, no entanto, entre o grupo fosfato do TPP e as cargas aniônicas do peptídeo análogo pela amina da quitosana possivelmente causou compactação das nanopartículas, conforme já descrito na literatura (GLÁUCIA-SILVA, et al., 2023). Tal fenômeno pôde ser observado nos resultados do tamanho dos nanossistemas (Tabela 1), onde a média do tamanho da nanopartícula branca demonstrou-se maior do que as médias dos tamanhos das demais amostras.

O potencial Zeta de uma amostra é uma característica mensurada indiretamente num sistema coloidal durante eletroforese da amostra, onde a mobilidade do material – a depender de variáveis analíticas como pH da amostra, constante dielétrica e viscosidade do sistema – determina, através da equação Henry de campos elétricos, o potencial elétrico entre o plano de cisalhamento de uma partícula suspensa e o meio em que ela se encontra. Quanto maior este potencial, maior será a nuvem eletrostática que envolve a partícula, e por sua vez menor a chance de interação entre partículas – logo, menor a chance de aglutinação das nanopartículas do sistema (LUNARDI et al., 2023). Dessa forma, as amostras aferidas demonstraram potenciais Zeta consistentes com outras nanopartículas de quitosana contendo peptídeos antimicrobianos presentes na literatura (GLÁUCIA-SILVA, et al., 2023) que exibiram comportamentos de estabilidade satisfatórios (Tabela 1). Além disso, sua carga positiva contribuiu com sua interação com elementos de carga negativa comumente presentes em membranas bacterianas (KHEMAISSA et al., 2022), assim condizente com seu efeito antibacteriano.

O Índice de Polidispersão, referente à medição da distribuição dos tamanhos de partículas presentes num sistema coloidal, atesta caso há congruência entre os tamanhos das partículas produzidas. De acordo com a literatura (NAUSHIN et al., 2024), as nanopartículas produzidas se encaixaram em um escopo mediano, ou mid-range, de polidispersão, que se encaixa em um espectro de $0.08 < PDI < 0.7$. Não obstante, as partículas demonstraram valores consistentes com a literatura (GLÁUCIA-SILVA, et al., 2023).

É válido ressaltar que a amostra ADS 2,5% demonstrou valores de tamanho médio, potencial Zeta e IPD incongruentes com as demais amostras, um provável resultado de condições de armazenamento e transporte. Ainda, visto que o potencial Zeta da nanopartícula branca não foi aferido, não foi possível elucidar se a presença do peptídeo catiônico impacta a carga da nanopartícula. Logo, urge aferir tais valores com novas amostras futuramente.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Dentre os resultados obtidos, observou-se uma maior concentração de nanopartícula necessária para inibir o crescimento bacteriano da cepa bacteriana de P. aeruginosa, Gram-negativa, do que a cepa de S. aureus, Gram-positiva, como um padrão dentre todas as amostras. Tal resultado é condizente com trabalhos que aferiram a atividade antimicrobiana da Stigmurina, peptídeo antimicrobiano do qual a StigA16 é derivado (PARENTE et al., 2018), onde cepas Gram-negativas obtiveram CIMs maiores do que cepas Gram-positivas. Tanto a Stigmurina, quanto a StigA16, quanto a nanopartícula contendo o peptídeo análogo possuem carga média positiva, e seu acúmulo nas membranas bacterianas causam sua deformação e subsequente ruptura (KHEMAISSA et al., 2022; PARENTE et al., 2018) – este é o mecanismo antibacteriano das amostras.

Dessa forma, é possível elucidar a possibilidade da utilização do sistema de nanopartículas como agente antimicrobiano contra cepas Gram-positivas, e estudos futuros com maiores concentrações do peptídeo podem elucidar concentrações inibitórias mais satisfatórias para espectros bacterianos mais amplos.

É válido ressaltar, ainda, que a solução de nanopartículas ausentes de peptídeo demonstrou concentrações inibitórias semelhantes às com o ativo, provavelmente devido à carga intrinsecamente positiva da própria nanopartícula que por si só possivelmente causa perturbações na membrana bacteriana. Logo, não se fez possível afirmar o escopo onde a presença do peptídeo impactou na ação antibacteriana da amostra.

Ensaio de dispersão em ágar Müeller-Hinton

Visando conferir a habilidade dos géis confeccionados a partir das soluções de nanopartículas de formarem um halo de inibição bacteriano em um ambiente nutricionalmente propício para a formação de colônias bacterianas, utilizando-se como controle negativo uma solução de Vancomicina ressuspensa à uma concentração de 250µg/mL, um antibiótico padrão ouro contra a cepa utilizada.

Os resultados do ensaio demonstraram halos de inibição consistentemente visualmente menores que o controle negativo. Comparativamente entre as amostras, observou-se um halo ligeiramente maior resultante da amostra NG-ADS 5%, embora tal afirmativa não tenha sido comprovada mediante sua medição. Ademais, a amostra NG-INC 5% particularmente demonstrou definições mais difusas nas bordas de seu halo de inibição, o que possivelmente indica um poder de inibição do crescimento bacteriano inferior às demais amostras mediante comparação da definição de seus halos. Adicionalmente, é válido ressaltar que o halo referente ao nanogel branco (NG-NPQ) teve seu tamanho visualmente semelhante às demais amostras; com isso, consistentemente com os demais resultados, não se fez possível afirmar caso a presença do peptídeo contribuiu para a ação antibacteriana, ou se esta se deu pela ação antibacteriana intrínseca da própria nanopartícula catiônica de quitosana.

Se faz de suma importância, portanto, a futura repetição do ensaio, com a adição de replicatas das amostras e da avaliação da formulação NG-ADS 2,5%, que não foi avaliada devido à sua indisponibilidade no momento da realização do ensaio. Adicionalmente, cabem a medição dos halos resultantes, assim como seu cálculo de média e desvio padrão, para possíveis interpretações mais acuradas dos resultados.

Conclusão

O presente trabalho demonstrou a viabilidade do desenvolvimento de nanogéis de quitosana e Pluronic F-127 como carreadores do peptídeo análogo StigA16. A caracterização físico-química confirmou a obtenção de sistemas coloidais estáveis, com tamanho nanométrico (97,15 a 133,2 nm), distribuição de tamanho adequada e potencial

Zeta positivo (+18,7 a +23,4mV), propriedade relevante para a interação com membranas bacterianas.

Nos ensaios microbiológicos, as formulações apresentaram atividade antibacteriana superior contra a cepa Gram-positiva Staphylococcus aureus em comparação à Gram-negativa Pseudomonas aeruginosa, destacando-se o método de incorporação (INC 2,5% e 5%) com menores valores de CIM. Adicionalmente, o ensaio de difusão em ágar indicou a possível capacidade dos nanogéis de liberarem o ativo e inibirem o crescimento bacteriano além da área de aplicação.

Conclui-se que o nanossistema desenvolvido é promissor para aplicação tópica no tratamento de infecções e auxílio no reparo tecidual. É cabível, para etapas futuras, a complementação da caracterização físico-química, a formulação de nanossistemas contendo concentrações mais elevadas do peptídeo, o ensaio de liberação e de incorporação do peptídeo nas nanopartículas e a repetição de forma mais aprofundada do ensaio de dispersão em ágar.

Referências

GAN, Quan; WANG, Tao. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, v. 59, n. 1, p. 24–34, 2007.

AAYUSH, Krishna et al. Development and characterization of sodium alginate and β-cyclodextrin nanoemulsions encapsulating betel leaf (Piper betle L.) extract for enhanced antimicrobial efficacy against foodborne pathogen. Food Chemistry, v. 463, p. 141227, jan. 2025.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11. ed. CLSI Standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

PHUC LE, Thi Minh et al.Preparation of curcumin-loaded pluronic F127/chitosan nanoparticles for cancer therapy. Advances in Natural Sciences Nanoscience and Nanotechnology, v. 4, n. 2, p. 025001, 2013.

ROCHA SOARES, K. S. et al. Antivenom production against Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas snake venoms using cross-linked chitosan nanoparticles as an immunoadjuvant. Toxins, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2018.

JHA, Rejeena; MAYANOVIC, Robert A. A review of the preparation, characterization, and applications of chitosan nanoparticles in nanomedicine. Nanomaterials (Basel, Switzerland), v. 13, n. 8, p. 1302, 2023.

PARENTE, Adriana Marina e. Silva et al.A comparative analysis of structural and functional attributes of four analog antimicrobial peptides derived from scorpion venom. Journal of Molecular Structure, v. 1378, n. 147153, p. 147153, 2026.

GLÁUCIA-SILVA, Fiamma et al.Tityus stigmurus-venom-loaded cross-linked chitosan nanoparticles improve antimicrobial activity. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 18, p. 9893, 2024.

LUNARDI, Claure N. et al.Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 99, n. 3, p. 627–639, 2021.

KHEMAISSA, Sonia; WALRANT, Astrid; SAGAN, Sandrine. Tryptophan, more than just an interfacial amino acid in the membrane activity of cationic cell-penetrating and antimicrobial peptides. Quarterly Reviews of Biophysics, v. 55, n. e10, p. e10, 2022.

NAUSHIN, Farzana et al. Structural and surface properties of pH-varied Fe2O3 nanoparticles: Correlation with antibacterial properties. ACS Omega, v. 9, n. 1, p. 464–473, 2024.

YUAN, Kaijing et al. Tyndall-effect-based colorimetric assay with colloidal silver nanoparticles for quantitative point-of-care detection of creatinine using a laser pointer pen and a smartphone. RSC Advances, v. 12, n. 36, p. 23379–23386, 2022.

PARENTE, Adriana M. S. et al. Analogs of the scorpion venom peptide Stigmurin: Structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. Toxins, v. 10, n. 4, p. E161, 2018.

Anexos



Figura 1: Demonstração do efeito Tyndall feito com caneta apontadora laser direcionada para um béquer contendo 5mL de nanopartícula ausente de peptídeo.



Tabela 1: Propriedades físico-químicas das nanopartículas de quitosana branca, incorporadas e adsorvidas com o peptídeo StigA16. Nota: o potencial Zeta da NPQ não foi aferido.



Tabela 2: Valores de Concentração Inibitória Mínima em µg/mL das nanopartículas vazias (NPQ) e incorporadas com o peptídeo análogo StigA16 para cepas de S. aureus (ATCC 25923) e de P. aeruginosa (ATCC 9027). Os resultados foram apresentados a partir da co



Figura 2: Placa de Petri contendo os resultados do ensaio de difusão em ágar. A: Vancomicina 250µg/mL (controle negativo de crescimento bacteriano); B: Nanogel NG-INC 2,5%; C: nanogel NG-INC 5%; D: nanogel NG-NPQ; E: nanogel NG-ADS 5%.

CÓDIGO: SB1750

AUTOR: VINICIUS DE SENA SILVA

ORIENTADOR: ADRIANO CALIMAN FERREIRA DA SILVA

TÍTULO: The Role of Tabebuia aurea Floral Detritus in Enhancing Leaf Litter Decomposition in Tropical Restinga Ecosystems

Resumo

Detritos reprodutivos vegetais são geralmente ricos em nutrientes e intermitentes, mas sua influência sobre a decomposição além da espécie de origem ainda é pouco compreendida. Avaliamos se o detrito floral de Tabebuia aurea, árvore de floração em massa, promove efeitos de mistura de litter em nível de comunidade e se esses efeitos dependem da biomassa floral. Em um experimento de common garden de 112 dias, tratamentos de: litters foliares de 10 espécies, uma mistura equitativa dessas espécies, detritos reprodutivos e gravetos foram decompostos isoladamente ou com adição baixa(1g) ou alta(2g) de detrito floral de T. aurea. O detrito floral apresentou maiores níveis de N, P e K e menores de fenóis que os litters receptores. A adição de flores acelerou a decomposição da maioria dos litters, produzindo efeitos relativos de mistura positivos e maior efeito médio em nível de comunidade sob alta adição floral. Algumas respostas foram dependentes do tipo de litter e não lineares, com alguns respondendo mais à menor adição e outros apresentando efeitos negativos. Os resultados demonstram que os efeitos do detrito floral ultrapassam os limites da espécie e do órgão vegetal de origem, evidenciando um papel biogeoquímico em escala de comunidade para espécies com floração em massa. Assim, a deposição concentrada de flores pode gerar hotspots biogeoquímicos, dependendo da qualidade do detrito floral, das características dos litters receptores e da proporção de flores na serapilheira.

Palavras-chave: Decomposição; Efeito de mistura de litter; Hotspots Biogeoquímicos.

TITLE: The Role of Tabebuia aurea Floral Detritus in Enhancing Leaf Litter Decomposition in Tropical Restinga Ecosystems

Abstract

Plant reproductive litter is generally nutrient-rich and intermittent, yet its influence on decomposition beyond the source species remains poorly understood. We assessed whether floral litter from Tabebuia aurea, a mass-flowering tree, promotes community-level litter mixing effects and whether these effects depend on floral biomass. In a 112-day common garden experiment, leaf litters from 10 species, an equal-mixture of these

species, reproductive litter, and twigs were decomposed alone or with low (1 g) or high (2 g) additions of T. aurea floral litter. Floral litter had higher N, P, and K and lower phenol concentrations than recipient litters. Flower addition accelerated decomposition of most litters, producing positive relative mixing effects and a greater mean community-level effect under high floral addition. Some responses depended on litter type and were non-linear, with some litters responding more strongly to the lower addition and others showing negative effects. These results demonstrate that floral litter effects extend beyond the boundaries of source species and plant organs, highlighting a community-scale biogeochemical role for mass-flowering species. Thus, concentrated flower deposition may generate biogeochemical hotspots depending on floral litter quality, recipient litter characteristics, and the proportion of flowers in the litter layer.

Keywords: Decomposition; Litter-mixing effect; Biogeochemical hotspots

Introdução

A decomposição de litter controla o retorno de carbono e nutrientes da biomassa da planta para o solo, conectando a composição da comunidade de plantas á biogeoquímica do ecossistema. Nos ecossistemas terrestres, esse processo é regulado pelo clima, decompositores e os fatores (traits) químicos e estruturais dos detritos, onde o detrito lábil e rico em nutrientes perde massa mais rápido que o detrito pobre em nutrientes ou de material estruturalmente resistente (Coûteaux and others 1995; Aerts 1997; Djukic and others 2018). Esses efeitos pós-vida dos desses fatores vegetais influenciam a disponibilidade de nutrientes no solo, armazenamento de carbono e os feedbacks pelos quais as plantas modificam seu ambiente subterrâneo (Prescott 2010; Hobbie 2015). Todavia, o litter como serrapilheira raramente se decompõe como espécies ou órgãos isolados. Ela se acumula como uma matriz heterogênea na qual os detritos de qualidade contrastante interagem, e essas interações entre tipos de serrapilheira podem gerar taxas de decomposição diferentes daquelas esperadas de seu comportamento individual. Esses efeitos da mistura de litter (LMEs) são positivos quando a decomposição em uma mistura supera a expectativa correspondente da monocultura e negativos quando o inverso ocorre(Gartner e Cardon 2004; Hättenschwiler e outros 2005; Gessner e outros 2010). Sínteses globais indicam que os efeitos positivos predominam, em média, mas a direção e a intensidade das respostas individuais continuam altamente dependentes do contexto (Liu e outros 2020; Mori e outros 2020; Porre e outros 2020). A transferência de nutrientes, o estímulo microbiano, melhores condições de umidade e maior heterogeneidade de habitat ou de recursos podem acelerar a decomposição, enquanto compostos secundários inibitórios, interferência física, imobilização de nutrientes, desequilíbrio estequiométrico ou uso preferencial de um componente de alta qualidade podem retardá-la. (Hättenschwiler and others 2005; Guenet and others 2010; Gessner and others 2010; Chapman and others 2013). Desse modo, os LMEs refletem ambas propriedades do litters misturados, apesar dessas propriedades poderem ser alteradas em resposta a biomassa relativa das serrapilheira que estão interagindo, pois a biomassa determina a quantidade de carbono lábil, nutrientes, compostos inibidores e a estrutura física introduzida na mistura (Gripp e outros 2018). Pesquisas sobre LMEs têm se concentrado principalmente a sobre o detrito foliar, apesar das plantas contribuírem com todos seus orgãos para a serrapilheira. Flores se diferenciam especialmente devido seu curto período de vida e alta concentração de água(Roddy and others 2023). Comparações interespecíficas também demonstram diferenças na alocação de elementos

entre os órgãos vegetais, onde pétalas geralmente possuem mais fósforo(P) e potássio(K) que as folhas. Essas características são coerentes com a rápida lixiviação e decomposição de flores em relação a folhas em vários sistemas (Wang and others 2016; Wang and others 2021; Alencar and others 2024a). Aqui testamos se o litter floral da T.aurea altera a decomposição da comunidade mais ampla de detritos de uma floresta costeira tropical através de um experimento de common-garden. Testamos duas hipóteses interligadas. A primeira, devido a alta taxa de nutrientes e rápida decomposição dessas flores, o nos previmos que o a adição de flores de T.aurea nos litters receptores produziria predominantemente efeitos de mistura de litter(LMEs) positivos não-aditivos ao longo das espécies e órgãos vegetais. A segunda, previmos que os LMEs positivos seriam mais intensos conforme a biomassa floral aumentasse devido a maior porcentagem de flores introduzir mais recursos lábeis. Uma confirmação dessas hipóteses revelaria um caminho em escala de comunidade pelo qual a fenologia reprodutiva de uma espécie que floresce em massa pode regular de forma desproporcional o ciclo de carbono e nutrientes na camada de detritos ao redor.

Metodologia

O experimento de decomposição e coleta do material vegetal foi conduzido em um fragmento preservado de Mata Atlântica no parque Parque Estadual Dunas do Natal(RN). A estrutura da vegetação e a fenologia da produção de folhas no local já foram descritas anteriormente (Silva e outros 2020; Bonato Asato e outros 2026). As espécies selecionadas para o detrito foliar foram de: Byrsonima gardneriana, Chamaecrista ensiformis, Coccoloba laevis, Eugenia azedal, Maytenus sp., Myrcia ramuliflora, Pera ferruginea, Psidium oligospermum, Schoepfia brasiliensis, T. aurea. Devido essas serem as espécies mais frequentemente coletadas próximas a indivíduos de T. aurea nos trabalhos de (Silva e outros 2020; Alencar e outros 2022) consequentemente a interação desses detritos com suas flores na serrapilheira torna-se especialmente relevante para o contexto da comunidade testado aqui. Desenho Experimental Foi definido uma parcela de 50m² dentro da área do estudo durante o período inicial de floração de T. aurea, Nenhuma das dez espécies focais ocorreu dentro da parcela, o que reduz a probabilidade de que legados específicos da serapilheira ou a vantagem do habitat original confundissem as comparações entre as serapilheiras receptoras (Ayres e outros 2009; Alencar e outros 2022). Os microcosmos experimentais consistiam em cilindros de plástico com 15 cm de diâmetro e 10 cm de altura. Aberturas de 1 cm de diâmetro na base e nas laterais permitiam a drenagem e o acesso de organismos do solo. Uma malha de nylon de 1 mm separou a serrapilheira do solo, permitindo o acesso de decompositores, e uma segunda camada de malha acima da serrapilheira impediu a entrada de matéria orgânica externa. Cada microcosmo recebeu uma camada de 5 cm de solo superficial homogeneizado e peneirado coletado dentro do plot experimental. O desenho experimental consistia de 13 tratamentos: dez de detritos de folhas de espécie única, uma mistura de massa equitativa de detritos de folhas das dez espécies, um de litter reprodutivo variado, um de gravetos lenhosos variados, cada uma dessas serrapilheiras receptoras possuindo 2g de massa seca. Cada microcosmo se decompôs sob três condições de detrito floral de T. aurea: sem flores, com uma adição baixa de 1 g, ou com uma adição alta de 2 g. Assim, os tratamentos de adição baixa e alta de flores produziram razões iniciais de biomassa flores/serrapilheira de 1:2 e 1:1, respectivamente. Cada tipo de tratamento possuiu 5 réplicas totalizando 195 microcosmos. Os dois níveis de detrito floral foram escolhidos para representar duas

posições plausíveis dentro da variação espacial esperada proporção flor/detrito entre indivíduos de T. aurea durante a floração em massa. Além de representar a heterogeneidade nas misturas de flores e detrito receptor em diferentes posições ao longo do gradiente de distância em torno das árvores-mãe ilustradas na Fig. 1, onde a abundância de flores é maior sob e próximo à copa e diminui para fora. A serra pilheira de outras espécies também se acumula sob T. aurea porque as copas vizinhas podem se sobrepor extensivamente. As razões portanto, fornecem pontos controlados ao longo de um gradiente plausível da camada de flores para a camada de detritos, em vez de distâncias fixas em metros. O experimento durou 112 dias e na sua retirada, o material dos microcosmos foi cuidadosamente removido em laboratório, limpo de solo aderido e de possível material estranho sendo seco a 60°C até massa constante. O material de flores remanescente foi removido e somente a massa final do tratamento receptora foi usada para quantificar sua decomposição. A perda da massa floral não foi quantificada porque a decomposição doadora não era a resposta de interesse, além de pouco representada. A decomposição sendo calculada como perda de massa: Perda de massa(%) = [(Mi -Mf / Mi] × 100 onde Mi; e Mf são as massas secas inicial e final do litter receptor, respectivamente. Química inicial da serrapilheira Foi quantificado N, P, K e fenóis totais como indicadores químicos iniciais da qualidade da serapilheira. N, P e K geralmente limitam a atividade dos decompositores, enquanto compostos fenólicos podem inibir enzimas microbianas ou reduzir a palatabilidade do substrato (Hättenschwiler e outros 2005; Oliveira e outros 2023). Para cada tratamento de recipiente-serapilheira e para flores de T. aurea, três subamostras independentes de pelo menos 3 g foram moídas até virar pó fino. O N total foi medido por digestão e destilação de Kjeldahl (Bremner 1960). O fósforo foi quantificado colorimetricamente através da reação com molibdato após digestão ácida (Murphy e Riley 1962), e o K foi medido por espectrometria de emissão de chama após digestão nítrico-perclórica.Os fenólicos totais foram medidos com um ensaio de Folin-Ciocalteu(Singleton e outros 1999).As concentrações são expressas como porcentagens da massa seca da serapilheira. Efeitos Relativos de mistura Para cada tratamento receptor e nível de adição floral foi quantificada a mudança proporcional na massa do receptor causada pela adição floral como um efeito relativo de mistura (RME): RMEi(%) = [(MLmixi - MLmono) / MLmono] × 100, onde MLmixi; é a perda de massa do litter receptor na réplica i da mistura de litter floral e receptor, e MLmono é a perda média de massa calculada a partir das cinco monoculturas replicadas do litter receptor correspondente. Onde valores positivos de RME indicam efeitos positivos não aditivos, litter receptor se decompôs mais rápido com flores do que só. Consequentemente, valores negativos de RME indicam efeitos negativos não aditivos. Análise estatística Medias e incertezas foram descritas com intervalos de confiança bootstrap não paramétricos corrigidos e acelerados de 95% (IC BCa) baseados em 9.999 reamostragens.). Diferenças químicas entre o litter floral de T. aurea e os litters receptor foram consideradas estatisticamente significativas quando o IC ±95% de um tratamento receptor não sobrepunha ao IC do litter floral.

Resultados e Discussões

O material floral de T. aurea acelerou a decomposição de um amplo conjunto de tratamentos em que ocorrem juntos, fornecendo forte apoio para nossa primeira hipótese. O efeito ultrapassou limites taxonômicos e de órgãos: as flores aumentaram a perda de massa de folhas conspecíficas e heterospecíficas, dos detritos reprodutivos

combinados e dos galhos lenhosos. Consequentemente, as respostas positivas a nível do tratamento auxiliaram para um RME médio positivo em escala de comunidade em ambos os níveis de biomassa floral. Nossa segunda hipótese recebeu um suporte mais parcial, que universal. A alta adição de flores gerou o maior RME médio geral, mas as respostas dentro dos tratamentos individuais de litter muitas vezes eram não lineares, inalteradas ou até invertidas à medida que a biomassa floral aumentava. Esses resultados ampliam demonstrações anteriores de interações recíprocas entre flores e folhas em T. aurea. (Alencar and others 2024a, 2025) mostrando que uma floração em massa de uma espécie pode modificar a decomposição ao longo do redor a comunidade de litter O contraste químico entre os litters doadores e receptores fornece uma base plausível para a predominância de efeitos positivos. As flores de T. aurea continham muito mais N, P e K do que qualquer litter receptor e menos fenólicos do que a maioria deles. Compostos lábeis encontrados nos litters florais podem estimular o crescimento de decompositores, enquanto os nutrientes adicionados podem relaxar as restrições estequiométricas na produção microbiana de enzimas extracelulares (Hättenschwiler e outros 2005; Guenet e outros 2010; Barantal e outros 2014). A transferência de nutrientes do litter floral para o litter receptor pobre em nutrientes e a ativação microbiana pelo carbono prontamente disponível podem, portanto, aumentar a decomposição de substratos que, de outra forma, seriam resistentes (Gartner e Cardon 2004; Chapman e outros 2013; Liu e outros 2020). Mecanismos semelhantes foram demonstrados ou propostos para a aceleração da decomposição de folhas promovida por flores em café e T. aurea no nível intraespecífico (Schmitt e Perfecto 2020; Alencar e outros 2024b, 2025), e o litter floral advindo de outros sistemas pode rapidamente alterar os estoques de nutrientes do solo (Wang e outros 2016). Nosso experimento foi projetado para testar se esses efeitos previamente estabelecidos em nível de espécie se aplicam a serrapilheira de toda a comunidade, ao invés de dividir seus mecanismos individuais. O forte contraste de nutrientes, junto com o RME em geral positivo, mostra que a influência de um doador de litter floral de alta qualidade pode se estender muito além de suas folhas conspecíficas (Alencar e outros 2025). A identidade do litter receptor e a proporção da mistura de litter foram ambas importantes. Como a mesma fonte de litter floral foi adicionada a todos os tratamentos, a variação entre os RMEs deve surgir de características(traits) do litter receptor, contrastes de características entre litter floral e litter receptor, ou a configuração física criada por cada combinação. A abundância relativa de detritos lábeis e resistentes pode alterar qual mecanismo domina (Kou e outros 2020). Em baixa abundância floral, nutrientes móveis podem ser transferidos para tecidos pobres em nutrientes e estimular a atividade dos decompositores sem substituir seu uso como substrato. À medida que a abundância de flores aumenta, o priming pode se fortalecer quando o fornecimento de carbono e nutrientes corresponde à demanda microbiana, mas pode enfraquecer ou se inverter em caso de desequilíbrio estequiométrico ou quando microrganismos e detritívoros exploram preferencialmente a matéria floral mais lábil em vez da matéria orgânica mais recalcitrante do substrato receptor (Hättenschwiler e outros 2005; Guenet e outros 2010; Chapman e outros 2013; Gripp e outros 2018; Liu e outros 2020). Metabólitos secundários não representados pelos fenólicos totais, diferenças na retenção de água e a compactação de folhas ou galhos podem alterar ainda mais o acesso microbiano ou de fauna. Esses processos podem explicar por que C. laevis, P. ferruginea e a mistura de folhas de dez espécies mostraram efeitos negativos nas proporções de flor para litter receptor, enquanto os gravetos lenhosos e várias espécies de folhas se decompuseram mais rápido em resposta à adição de flores. A inversão entre biomassa floral baixa e alta para C. laevis e para a mistura de dez espécies é especialmente instrutiva: aumentar a

quantidade de matéria orgânica de alta qualidade não produz necessariamente um aumento singular da decomposição, corroborando a alta idiossincrasia que sustenta os LMEs sobre decomposição (Epps e outros 2007). Portanto, as previsões de LME devem integrar: as características fornecidas pelo doador floral, as características do substrato receptor e a biomassa relativa na qual interagem. A adição de flores também é funcionalmente distinta da presença contínua de uma espécie de árvore que produz folhas de alta qualidade. As folhas geralmente dominam a quantidade anual de serrapilheira acima do solo e chegam ao longo de semanas ou meses, enquanto a floração síncrona pode fornecer um pulso de recurso mais curto e quimicamente distinto, sobreposto à camada de serapilheira existente (Schmitt e Perfecto 2020; Wang e outros 2016). Entre espécies lenhosas tropicais, as flores se decompõem mais rápido e diferem sistematicamente das folhas em características relacionadas a nutrientes e água (Alencar e outros 2024a; Roddy e outros 2023; Tong e outros 2024). Esse contraste a nível de órgão vegetal permite que um indivíduo com floração em massa intensifique a decomposição sem alterar a identidade ou a biomassa existente da comunidade de plantas ao redor. Porque a deposição de flores está concentrada sob as copas das árvores-mães e diminui com a distância, nossas adições de litter de flores baixas e altas para receptores podem representar pontos contrastantes ao longo de um gradiente espacial de detritos. Perto de uma árvore em floração, uma alta proporção de flores pode amplificar a decomposição do litter de fundo; mais longe, a diminuição da abundância floral pode enfraquecer ou alterar o efeito. A decomposição direta das flores e seus LMEs indiretos podem, portanto, gerar um hotspot biogeoquímico dentro da matriz florestal mais ampla e um hotmoment durante a estação de floração (Ostfeld e Keesing 2000; McClain e outros 2003; Kuzyakov e Blagodatskaya 2015). Esse padrão espacial compartilha sua geometria dependente da distância em torno das árvores parentais com a hipótese de Janzen-Connell, mas os dois mecanismos divergem fortemente no que essa geometria produz. Efeitos Janzen-Connell surgem porque inimigos naturais específicos do hospedeiro se concentram perto de adultos conspecíficos, impondo dependência negativa de densidade conspecífica que remove desproporcionalmente recrutas conspecíficos próximos à árvore parental; como esse custo incide mais fortemente sobre a espécie localmente comum, ele atua como um mecanismo estabilizador, análogo à dependência negativa de frequência na teoria da coexistência, que favorece vizinhos mais raros ou heterospecíficos e ajuda a manter a diversidade local (Janzen 1970; Connell 1971; Chesson 2000). O padrão que descrevemos aqui também pode organizar a qualidade do litter e a renovação de nutrientes ao longo de um gradiente de distância a partir da árvore parental, mas através da decomposição em vez da mortalidade, e pode gerar um benefício em vez de um custo perto da árvore parental, levantando a questão de quem captura esse benefício e com que consequência para a coexistência. Por exemplo, a decomposição associativa oferece um quadro para essa questão. Misturas de litter compostas de espécies quimicamente ou estruturalmente diferentes tendem a decompor de forma mais eficiente do que se esperaria apenas de seus componentes, e esse ganho de eficiência é pensado para retroalimentar a agregação espacial das plantas vivas: espécies com características pós-vida contrastantes se beneficiam de crescer perto um do outro, favorecendo padrões de associação nas comunidades de plantas (Barbe e outros 2017, 2020). As flores de Tabebuia aurea representam um caso extremo desse tipo de dissimilaridade nesse sistema, suas concentrações de N, P e K superaram as de qualquer outro litter receptor, e seu conteúdo fenólico esteve entre os mais baixos (Fig. 2), e esse contraste foi refletido em seu efeito: o litter floral não apenas se decompôs rapidamente, mas também acelerou a decomposição em quase toda a matriz de litter ao redor (Fig. 3). Em termos de

decomposição associativa, a T. aurea, portanto, se comporta como um subsídio de recurso para seus vizinhos heteroespecíficos, quimicamente distinta o suficiente para aumentar a decomposição e, presumivelmente, a liberação de nutrientes de qualquer matéria orgânica que interaja com suas flores. Se esse subsídio se traduz em um benefício de crescimento ou estabelecimento para plantas vizinhas, isso forneceria uma via facilitadora, em vez de antagônica, para o tipo de manutenção de diversidade local classicamente atribuída à dinâmica Janzen-Connell. No entanto, a mesma lógica espacial que concentra flores próximas à planta-mãe também concentra o subsídio ali. Porque a deposição de flores aumenta em direção à árvore e porque o RME em toda a comunidade com adição de litter floral foi mais forte em misturas com alta proporção de flores em relação aos restos de plantas receptores (Fig. 3B; a média geral do RME foi maior com alta biomassa floral), quaisquer indivíduos que se estabeleçam mais próximos de uma T. aurea florescendo devem experimentar o maior aumento de fertilidade, e a vizinhança imediata da árvore-mãe, incluindo quaisquer seus próprios recrutas conspecíficos, é precisamente onde esse aumento é maior. Assim, Tabebuia aurea pode ser simultaneamente a principal provedora de subsídio e a principal beneficiária desse mecanismo, o que a coloca em potencial tensão com Janzen-Connell, em vez de apenas em analogia a ele: enquanto os inimigos específicos de hospedeiro impõem um custo dependente da distância, maior para conspecíficos próximos à árvore-mãe, esse mecanismo poderia impor um benefício dependente da distância, que também é maior próximo à mãe. Se o resultado líquido favorece a diversidade ou reforça o domínio local de T. aurea dependeria então de quais recrutas, conspecíficos ou heteroespecíficos, na verdade se estabelecem sob as copas floridas e quanto de cada subsídio de fertilidade cada um capta, uma questão que nosso experimento não consegue resolver por conta própria. De forma mais ampla, o litter pode influenciar o desempenho das plantas por meio de mudanças físicas na serrapilheira, mudanças químicas na disponibilidade de nutrientes e mudanças bióticas nas comunidades de decompositores (Hobbie 2015; Veen e outros 2019), então eventos de floração em massa repetidos poderiam, plausivelmente, afetar o recrutamento ou crescimento sob e ao redor das T. aurea florescendo ao longo de várias estações. Testar qual lado da tensão descrita acima prevalece de fato, custos induzidos por inimigos versus benefícios gerados pela decomposição, e se os benefícios são capturados principalmente por recrutas conspecíficos ou heteroespecíficos, exigiria experimentos que vão além das taxas de decomposição para ligar deposição floral, liberação de nutrientes, composição de decompositores e desempenho das mudas em função da distância das árvores em floração. Nosso experimento não mediu nem o desempenho das plantas nem a montagem da comunidade, então as consequências de coexistência propostas aqui devem ser testadas em estudos futuros. Dois problemas definem o próximo passo para ampliar esses resultados no campo. Primeiro, as proporções reais de flores:litter de fundo sob T. aurea ainda não foram quantificadas. As proporções de 1:2 e 1:1 foram escolhidas para cobrir parte da variação espacial e temporal esperada entre datas de floração, indivíduos e distâncias das copas parentais, mas ainda não podem ser atribuídas a distâncias específicas em metros. Mapear a deposição floral junto com a massa de detrito residente permitirá que os RMEs observados experimentalmente sejam integrados entre árvores comprometer a lógica do gradiente de distância do experimento. Segundo, o modelo common garden minimizou intencionalmente os legados do solo específicos de cada espécie para que os efeitos da identidade do receptor e da proporção floral pudessem ser comparados em um ambiente de decompositores compartilhado. Abaixo de uma T. aurea adulta, comunidades de decompositores repetidamente expostas a pulsos florais poderiam fortalecer,

enfraquecer ou modificar de outra forma o efeito. A vantagem do campo nativo pode acelerar a decomposição sob espécies de plantas familiares (Ayres e outros 2009), e a hipótese de correspondência fenologia-substrato prevê adaptação ao temporização sazonal das adições recorrentes de serapilheira (Pearse e outros 2014). No entanto, os efeitos de campo local não são universais neste local (Alencar e outros 2022). Essas considerações não representam falhas em testar o objetivo do estudo, que era estabelecer se os efeitos não aditivos provocados por flores se estendem das interações específicas de folhas para a serapilheira em nível de comunidade. Medições isotópicas, microbianas, faunísticas e dos fluxos de nutrientes serão valiosas para quantificar a contribuição relativa dos mecanismos que estudos anteriores de flores e folhas já mostraram ser plausíveis.

Conclusão

Nossos resultados identificam espécies de floração em massa como possíveis organizadoras da heterogeneidade bioquímica em pequena escala. As flores de Tabebuia aurea atuaram não apenas como detrito de decomposição rápida, mas também como um recurso doador que alterou o destino da comunidade de serapilheira existente. O efeito não aditivo positivo foi, em média, mais forte quando a biomassa floral era alta, mas reversões específicas por espécie mostraram que a qualidade do doador sozinha não pode prever os resultados locais. Ao criar adições recorrentes e espacialmente concentradas de detrito de alta qualidade, árvores de floração massiva podem funcionar como ilhas de fertilidade transitórias, hotspots biogeoquímicos ou espécies-chave candidatas para redistribuição de nutrientes. Se efeitos comparáveis ocorrerem entre diferentes táxons, a fenologia reprodutiva pode influenciar o desempenho das plantas não apenas pela própria reprodução, mas também por efeitos pós-vida mediado pela decomposição e devolução de nutrientes. Estudos futuros devem testar se esses hotspots nucleiam a diversidade de plantas por meio da decomposição associativa e devem relacionar a quantidade e qualidade da serapilheira floral às características da serapilheira receptora, respostas dos decompositores, desempenho de plântulas e distância das árvores florescentes ao longo do tempo (Barbe e outros 2017, 2020).

Referências

Aerts R. 1997. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. Oikos 79:439-449. Alencar MIG, Belo AYSP, Silva JLA, Asato AEB, Gomes EF, Oliveira VS, Teixeira JO, Monte OS, Mota AS, Pereira VML, Dantas SS, Silva GHS, Goto BT, Souza AF, Caliman A. 2022. Hard to predict! No clear effects of home-field advantage on leaf litter decomposition in tropical heath vegetation. Journal of Tropical Ecology 38:462-471. Alencar MIG, Guariento RD, Guenet B, Carneiro LS, Voigt EL, Caliman A. 2024a. “Blooming” of litter-mixing effects: the role of flower and leaf litter interactions on decomposition in terrestrial and aquatic ecosystems. Biogeosciences 21:3165-3182. Alencar MIG, Dias ATC, Asato AEB, Caliman A. 2024b. Patterns of decomposition and functional traits for flower and leaf litter in tropical woody species. Oecologia 206:253-264. Alencar MIG, Guenet B, Amado AM, Caliman A. 2025. When blooming, we recycle faster! Reciprocal intraspecific litter-mixing effects of floral and leaf litter decomposition. Proceedings of

the Royal Society B: Biological Sciences 292:20250234. Ayres E, Steltzer H, Simmons BL, Simpson RT, Steinweg JM, Wallenstein MD, Mellor N, Parton WJ, Moore JC, Wall DH. 2009. Home-field advantage accelerates leaf litter decomposition in forests. Soil Biology and Biochemistry 41:606-610. Barantal S, Roy J, Fromin N, Schimann H, Hättenschwiler S. 2011. Long-term presence of tree species but not chemical diversity affect litter mixture effects on decomposition in a neotropical rainforest. Oecologia 167:241-252. Barantal S, Schimann H, Fromin N, Hättenschwiler S. 2014. C, N and P fertilization in an Amazonian rainforest supports stoichiometric dissimilarity as a driver of litter diversity effects on decomposition. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences Barbe L, Jung V, Prinzing A, Bittebiere AK, Butenschoen O, Mony C. 2017. Functionally dissimilar neighbors accelerate litter decomposition in two grass species. New Phytologist 214:1092-1102. Barbe L, Mony C, Jung V, Uroy L, Prinzing A. 2020. Associational decomposition: after-life traits and interactions among decomposing litters control during-life aggregation of plant species. Functional Ecology 34:1956-1966. Bremner JM. 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. Journal of Agricultural Science 55:11-33. Carpenter J, Bithell J. 2000. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. Statistics in Medicine 19:1141-1164. Chapman SK, Newman GS, Hart SC, Schweitzer JA. 2013. Leaf litter mixtures alter microbial community development: mechanisms for non-additive effects in litter decomposition. PLoS ONE 8:e62671. Coûteaux MM, Bottner P, Berg B. 1995. Litter decomposition, climate and litter quality. Trends in Ecology & Evolution 10:63-66. Djukic I, Kepfer-Rojas S, Schmidt IK, Larsen KS, Beier C, Berg B, Verheyen K, TeaComposition Network. 2018. Early stage litter decomposition across biomes. Science of the Total Environment 628-629:1369-1394. Gartner TB, Cardon ZG. 2004. Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter. Oikos 104:230-246. Gessner MO, Swan CM, Dang CK, McKie BG, Bardgett RD, Wall DH, Hättenschwiler S. 2010. Diversity meets decomposition. Trends in Ecology & Evolution 25:372-380. Gripp AR, Esteves FA, Carneiro LS, Guariento RD, Figueiredo-Barros MP, Coq S, Milcu A, Caliman A. 2018. Weak to no effects of litter biomass and mixing on litter decomposition in a seasonally dry tropical forest. Pedobiologia 68:20-23. Guenet B, Danger M, Abbadie L, Lacroix G. 2010. Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. Ecology 91:2850-2861. Hättenschwiler S, Tiunov AV, Scheu S. 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 36:191-218. Hobbie SE. 2015. Plant species effects on nutrient cycling: revisiting litter feedbacks. Trends in Ecology & Evolution 30:357-363. Janzen DH. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. American Naturalist 104:501-528. Kuzyakov Y, Blagodatskaya E. 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept and review. Soil Biology and Biochemistry 83:184-199. Liu J, Liu X, Song Q, Compson ZG, LeRoy CJ, Luan F, Wang H, Hu Y, Yang Q. 2020. Synergistic effects: a common theme in mixed-species litter decomposition. New Phytologist 227:757-765. McClain ME, Boyer EW, Dent CL, Gergel SE, Grimm NB, Groffman PM, Hart SC, Harvey JW, Johnston CA, Mayorga E, McDowell WH, Pinay G. 2003. Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. Ecosystems 6:301-312. Mori AS, Cornelissen JHC, Fujii S, Okada K, Isbell F. 2020. A meta-analysis on decomposition quantifies afterlife effects of plant diversity as a global change driver. Nature Communications 11:4547. Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta 27:31-36. Oliveira VS, Alencar MIG, Belo AYSP, Gomes EF, Teixeira JO, Silva JLA, Asato AEB, Pereira VML, Mota AS, Monte OS, Silva GHS, Caliman A.

2023. Physical traits are better drivers than secondary compounds for leaf litter decomposition in a tropical heath vegetation. Flora 309:152402. Pearse IS, Cobb RC, Karban R. 2014. The phenology-substrate-match hypothesis explains decomposition rates of evergreen and deciduous oak leaves. Journal of Ecology 102:28-35. Porre RJ, van der Werf W, De Deyn GB, Stomph TJ, Hoffland E. 2020. Is litter decomposition enhanced in species mixtures? A meta-analysis. Soil Biology and Biochemistry 145:107791. Prescott CE. 2010. Litter decomposition: what controls it and how can we alter it to sequester more carbon in forest soils? Biogeochemistry 101:133-149. Roddy AB, Jiang GF, Cao K, Simonin KA, Brodersen CR. 2019. Hydraulic traits are more diverse in flowers than in leaves. New Phytologist 223:193-203. Roddy AB, Guilliams CM, Fine PVA, Mambelli S, Dawson TE, Simonin KA. 2023. Flowers are leakier than leaves but cheaper to build. New Phytologist 239:2076-2082. Schmitt L, Perfecto I. 2020. Who gives a flux? Synchronous flowering of Coffea arabica accelerates leaf litter decomposition. Ecosphere 11:e03186. Silva JLA, Souza AF, Santiago LS, Gripp AR, Asato AEB, Silva GHS, Alencar MIG, Caliman A. 2020. Small biodiversity effects on leaf litter production of a seasonal heath vegetation. Journal of Vegetation Science 31:877-886. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299:152-178. Tong BJ, Zhao QJ, Li HY, Zhou Y, Li H, Li JW. 2024. Comparative nutrient concentration and resorption dynamics in petals and leaves. Physiologia Plantarum 176:e14626. Veen GF, Fry EL, ten Hooven FC, Kardol P, Morriën E, De Long JR. 2019. The role of plant litter in driving plant-soil feedbacks. Frontiers in Environmental Science 7:168 Wang J, Xu B, Wu Y, Gao J, Shi F. 2016. Flower litters of alpine plants affect soil nitrogen and phosphorus rapidly in the eastern Tibetan Plateau. Biogeosciences 13:5619-5631 Wang J, Xu B, Wu Y, Gao J, Shi F, Wu N. 2021. Effect of inflorescence litter from distinct species and life forms on soil nutrients and microbial biomass in the eastern Tibetan Plateau. Global Ecology and Conservation 31:e01825. Wood M. 2005. Bootstrapped confidence intervals as an approach to statistical inference. Organizational Research Methods 8:454-470.

Anexos



Figura 1.



Figura 2



Figura 3